

ESTER YOSHIE YOSINO DA SILVA

**PROPRIEDADES FUNCIONAIS “IN VITRO” E “IN VIVO” DE ALHOS FRESCOS E
PROCESSADOS**

BRASÍLIA

2009

**UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

ESTER YOSHIE YOSINO DA SILVA

**PROPRIEDADES FUNCIONAIS “IN VITRO” E “IN VIVO” DE ALHOS
FRESCOS E PROCESSADOS**

**Tese apresentada como requisito para a
obtenção do Título de Doutor em Ciências
da Saúde pelo Programa de Pós-
Graduação em Ciências da Saúde da
Universidade de Brasília.**

Orientador: Prof^o Dr. Celso Luiz Moretti

Brasília

2009

ESTER YOSHIE YOSINO DA SILVA

PROPRIEDADES FUNCIONAIS “IN VITRO” E “IN VIVO” DE ALHOS FRESCOS E PROCESSADOS

Tese apresentada como requisito para a obtenção do Título de Doutor em Ciências da Saúde pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade de Brasília.

Aprovado em 16/12/2009

BANCA EXAMINADORA

Prof^o. Dr. Celso Luiz Moretti – Presidente da Banca
Embrapa Hortaliças

Dr^a. Leonora Mansur Mattos – Membro da Banca
Embrapa Hortaliças

Prof^a. Dr^a. Wilma Maria Coelho Araújo – Membro da Banca
Universidade de Brasília

Dr^a. Cristina Maria Monteiro Machado – Membro da Banca
Embrapa Agroenergia

Dr. Francisco Vilela Resende – Membro da Banca
Embrapa Hortaliças

Prof^a. Dr^a. Marie Togashi – Membro Suplente da Banca
Universidade de Brasília

Silva, Ester Yoshie Yosino da.

Propriedades funcionais “in vitro” e “in vivo” de alhos frescos e processados /
Ester Yoshie Yosino da Silva

Tese de doutorado/ Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília.
Brasília, 2009.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Prof^o. Dr. Celso Luiz Moretti

1. Alho 2. Alicina. 3. Compostos organossulfurados 5. Atividade antioxidante
5. Metabolismo lipídico 6. Infarto agudo do miocárdio 7. Ratos

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada, Caminhando e
semeando, no fim terás o que colher”.*

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Professor Dr. Celso Luiz Moretti, pela oportunidade, orientação, confiança e compreensão durante todos esses anos.

À Professora Dra Wilma Maria Coelho Araújo, pela amizade, orientação e ajuda proporcionada antes e durante a realização deste curso.

À Dra Leonora Mansur Mattos, pela orientação, suporte e apoio durante a realização deste trabalho.

À Professora Dra Vânia Ferreira, pela ajuda prestada na elaboração dos experimentos *in vivo*.

Ao meu esposo Sebastião Pedro, pelo apoio, ensinamentos e paciência durante todo este período.

Ao meu filho Ivan Pedro que me ensinou a ter paciência, força e muita coragem.

A minha mãe pelo contínuo incentivo.

Aos funcionários dos Laboratórios de Pós-Colheita e Compostos Funcionais da Embrapa Hortaliças, João Batista Gomes, José Carlos Rodrigues da Silva e Ricardo Luiz Vasconcelos Ribeiro por todo auxílio prestado.

Aos funcionários do Centro de Cirurgia Experimental – CIEX da FS/UnB, Gabriela Mariângela Farias de Oliveira e Rafael Rocha de Andrade, por toda a ajuda na condução dos experimentos *in vivo*.

Ao Sr. José Tavares dos Santos (Sr. Dedé) pela ajuda na condução dos experimentos *in vivo* no biotério da FS/UnB.

Aos funcionários do Centro de Patologia Clínica do Hospital Universitário de Brasília – HUB, Ana Beatriz Fabrício de Melo e Robério Antonio Araújo, pelos serviços prestados nas análises bioquímicas.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências da Saúde, Edigrês Alves de Souza e Shirleide Vasconcelos Ribeiro, pela atenção e orientação prestadas.

À Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa.

A todos, que direta ou indiretamente fizeram parte deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

RESUMO

O alho (*Allium sativum* L.) possui 33 compostos organossulfurados que variam de acordo com o processamento utilizado e diferentes condições de estocagem. A alicina é o composto ativo mais comum do alho, representando cerca de 70% dos compostos sulfurados presentes neste bulbo. Este estudo teve como objetivo determinar a influência do processamento e armazenamento nas propriedades físico-químicas e funcionais em diferentes cultivares de alho (estudo “in vitro”) e avaliar os efeitos fisiológicos dos compostos funcionais sobre o metabolismo lipídico e o infarto agudo do miocárdio (estudo “in vivo”). Para tanto, bulbos de alho das cultivares Caçador e Peruano foram obtidos em campos experimentais da Embrapa Hortaliças e da cultivar Jinxiang, importada da China, foram obtidos da CEASA-DF, sendo descascados, liofilizados e moídos, obtendo-se o alho em pó liofilizado para todas as cultivares e o alho fresco apenas descascado, também para todas as cultivares. No estudo “in vitro”, os materiais submetidos aos diferentes processos foram avaliados quanto as variáveis físico-químicas (umidade, sólido solúveis, acidez titulável e pH) e funcionais (atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, compostos fenólicos totais e teor de alicina). Observou-se que para o alho fresco não houve diferença significativa quanto aos teores de umidade, sólidos solúveis, pH e teor de alicina entre as cultivares avaliadas, porém houve diferença significativa no teor de acidez, na atividade antioxidante e compostos fenólicos totais. Para o alho liofilizado houve diferença significativa na atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e teor de alicina. O processo de liofilização causou redução significativa nos teores de alicina para a cultivar Jinxiang (91%); na atividade antioxidante para as cultivares Jinxiang (66%), Caçador (53%) e Peruano (30%) e no conteúdo de compostos fenólicos totais para as cultivares Caçador (46%) e Jinxiang (40%). Durante o período de armazenamento de 60 dias a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e umidade relativa ($70 \pm 2\%$) não houve alteração nos teores de umidade e pH para as cultivares estudadas. Houve alteração significativa quanto aos teores de acidez titulável e sólidos solúveis indicando que essas características se alteram pelo armazenamento e entre diferentes cultivares. Todas as cultivares avaliadas apresentaram diminuição significativa na atividade antioxidante e aumento significativo no conteúdo de compostos fenólicos totais. Quanto ao teor de alicina a cultivar Caçador apresentou melhor estabilidade mantendo-se inalterada durante o

período de estocagem. As cultivares Peruano e Jinxiang apresentaram redução significativa a partir dos 45 e 15 dias de armazenamento, respectivamente. No estudo “in vivo” foram realizados dois experimentos, sendo um sem esforço físico - SEF (para avaliar o efeito do alho no metabolismo lipídico) e outro com esforço físico - CEF (para avaliar o efeito do alho no IAM), com duração de 15 dias para cada experimento. No 16º dia, os animais do experimento CEF passaram por atividade física exaustiva de natação, por no mínimo 50 min, em piscina redonda com água a temperatura ambiente. A seguir, os animais foram anestesiados com quetamina e xilazina e sacrificados. O sangue foi retirado por pulsão cardíaca para análise bioquímica (Triglicerídeos, Colesterol Total, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, Glicose, Creatinoquinase - CK, Creatinoquinase fração MB - CK-MB, Lactato desidrogenase - LHD, Transaminase glutâmico oxalacética - TGO e Transaminase glutâmico pirúvica - TGP. Houve redução do peso corpóreo e ingestão diária de ração para os grupos suplementados com alho em condições normo e hiperlipídicas. Para o metabolismo lipídico verificou-se que a ingestão de alho em condições normolipídicas reduziu significativamente os níveis de triglicerídeos e VLDL-colesterol. Em relação ao IAM o alho não atuou como efeito preventivo, mas pode atuar de forma positiva na sua redução quando em condições hiperlipídicas.

Palavras-chave: alho; alicina; compostos organossulfurados; atividade antioxidante; metabolismo lipídico; infarto agudo do miocárdio e ratos.

ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) has 33 organosulfur compounds that vary with the processing used and different storage conditions. Allicin is the most common active ingredient of garlic, representing about 70% of the sulfur compounds in the bulb. This study aimed to determine the influence of processing and storage on the physico-chemical properties and functional in different cultivars of garlic (study "in vitro") and assessing the physiological effects of functional foods on lipid metabolism and myocardial infarction (study "in vivo"). For both bulbs of garlic cultivars Caçador and Peruano were obtained in experimental fields of Embrapa Vegetables and cultivar Jinxiang, imported from China, were obtained from CEASA-DF, and peeled, dried and ground, resulting in the freeze-dried garlic powder for all cultivars and just peeled fresh garlic, also for all cultivars. In the study "in vitro", the materials submitted to the different processes were evaluated for physico-chemical (moisture, solid content, acidity and pH) and functional (antioxidant activity using system β -carotene/ linoleic acid, total phenolic compounds and content of allicin). It was observed that for the fresh garlic was no significant difference between moisture content, soluble solids, pH and allicin among cultivars, but there was no significant difference in acid content, in antioxidant activity and phenolic compounds. For freeze-dried garlic was significant difference in antioxidant activity, total phenolic compounds and allicin content. The freeze-drying caused a significant reduction in the levels of allicin to cultivar Jinxiang (91%) in antioxidant activity in cultivars Jinxiang (66%), Caçador (53%) and Peruano (30%) and content of total phenolics compounds the cultivars Caçador (46%) and Jinxiang (40%). During the storage period of 60 days at $22 \pm 1^\circ\text{C}$ and relative humidity ($70 \pm 2\%$) no change in moisture content and pH for the cultivars. There was a significant change for the levels of acidity and soluble solids indicating that these characteristics are altered by the storage and among different cultivars. All cultivars showed a significant decrease in antioxidant activity and a significant increase in the content of total phenolic compounds. The allicin content of the cultivar Caçador presented the best stability remained unchanged during the storage period. Cultivars Peruano and Jinxiang showed a significant reduction from 45 to 15 days of storage, respectively. In the study "in vivo" were carried out two experiments, one without physical exertion - SEF (to assess the effect of garlic on lipid metabolism) and the other with physical exertion - CEF (to assess the effect of garlic in AMI), lasting 15

days for each experiment. The 16th day, animals of the experiment with physical effort passed for exhaustive exercise of swimming, for at least 50 min in round pool with water at room temperature. Then, the animals were anesthetized with ketamine and xylazine and sacrificed. Blood was removed for biochemistry analysis (Triglycerides, Total Cholesterol, HDL-cholesterol, VLDL-cholesterol, glucose, creatine kinase - CK, creatine kinase MB fraction - CK-MB, lactate dehydrogenase - LHD, glutamic oxalacetic transaminase - GOT and Transaminase glutamic pyruvic transaminase - GPT. There was a reduction of body weight and feed intake for the groups supplemented with garlic in normal and hyperlipidemic conditions. For the lipid metabolism was found that the intake of garlic under normal-fat significantly reduced levels of triglycerides and VLDL-cholesterol. For the IAM garlic not acted as a preventive, but may act positively in reducing when in hyperlipidemic conditions.

Keywords: Garlic; allicin; organosulfur compounds; antioxidant activity; lipidic metabolism; myocardial acute infarction; rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura	pág.
Figura 1 – Transformação da aliina em alicina por via enzimática	31
Figura 2 – Modificações químicas no alho (<i>Allium sativum</i> L.)	36
Figura 3 – Fluxograma do processo de obtenção do extrato etanólico de alho	57
Figura 4 – Acondicionamento dos animais experimentais	64
Figura 5 – Animal alimentado por gavagem	69
Figura 6 – Animal anestesiado pela via intraperitoneal	70
Figura 7 – Retirada de sangue por pulsão cardíaca	71
Figura 8 – Comportamento do animal caracterizado por <i>fuga</i> , no teste de nado forçado	72
Figura 9 – Comportamento do animal caracterizado por imobilidade, no teste de nado forçado	73
Figura 10 – Formação da alicina pela aliina em alho fresco	77
Figura 11 – Formação da alicina a partir do DADS	78
Figura 12 – Padrão cromatográfico para o dialil dissulfeto	82
Figura 13 – Cromatograma da síntese de alicina, 6 horas depois do início da reação	82
Figura 14 – Cromatograma da síntese da alicina depois da lavagem com bicarbonato de sódio e água deionizada	83
Figura 15 – Cromatograma da síntese da alicina depois da diluição com 500 mL de água deionizada	83
Figura 16 – Cromatograma da síntese da alicina após evaporação com hexano	84
Figura 17 – Curva de descolorimento do β -caroteno das amostras de alho fresco, das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang, do controle e do padrão BHT	96
Figura 18 – Curva de descolorimento do β -caroteno das amostras de alho liofilizado, das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang, do controle e do padrão BHT	97

Figura 19 – Média da atividade antioxidante total dos extratos etanólico de alho fresco e liofilizado, medida pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico	98
Figura 20 – Média do conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos etanólico de alho fresco e liofilizado	99
Figura 21 – Transformação da aliina em alicina por via enzimática	108
Figura 22 – Variações no teor de umidade (%) das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR	112
Figura 23 – Variações no conteúdo de sólidos solúveis ($^\circ\text{Brix}$) das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR	112
Figura 24 – Variações no conteúdo de acidez total titulável (meq/kg) das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR	113
Figura 25 – Variações no conteúdo de pH das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR	114
Figura 26 – Variações no teor de alicina (mg/g M.F.) das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR	115
Figura 27 – Variações na atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico (%) das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR	117
Figura 28 – Variações no conteúdo de compostos fenólicos totais das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR	118
Figura 29 – Comportamento do animal caracterizado por <i>fuga</i> , no teste de nado forçado	150
Figura 30 – Comportamento do animal caracterizado por imobilidade, no teste de nado forçado	150

Figura 31 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de CK dos animais experimentais	159
Figura 32 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de CK-MB dos animais experimentais	160
Figura 33 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de LDH dos animais experimentais	162
Figura 34 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de TGO dos animais experimentais	163
Figura 35 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de TGP dos animais experimentais	164
Figura 36 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de Colesterol Total dos animais experimentais	167
Figura 37 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de HDL-Colesterol dos animais experimentais	168
Figura 38 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de VLDL-Colesterol dos animais experimentais	169
Figura 39 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de Triglicerídeos dos animais experimentais	170
Figura 40 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de Glicose dos animais experimentais	171

LISTA DE TABELAS

Tabela	pág.
Tabela 1 – Principais compostos bioativos presentes nos alimentos	26
Tabela 2 – Composição centesimal do alho cru de acordo com a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2008)	32
Tabela 3 - Composição química do alho cru de acordo com o USDA (Nutrient Database for Standard Reference, 2008)	33
Tabela 4 – Grupos de estudo a serem avaliados após indução da hiperlipidemia, com e sem a influência do alho	65
Tabela 5 – Número de animais a serem utilizados por grupo de estudo, após indução da hiperlipidemia, com e sem a influência do alho	66
Tabela 6 – Grupos de estudo a serem avaliados no infarto agudo do miocárdio, após indução da hiperlipidemia, com e sem influência do alho	67
Tabela 7 – Número de animais a serem utilizados por grupo de estudo na avaliação do infarto agudo do miocárdio, após indução da hiperlipidemia, com e sem a influência do alho	67
Tabela 8 – Composição das dietas experimentais	68
Tabela 9 – Determinação da umidade, sólidos solúveis, acidez titulável e pH das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang	92
Tabela 10 – Resultados do conteúdo de alicina das amostras de extrato aquoso de alho fresco e liofilizado	93
Tabela 11 – Composição das dietas experimentais	128
Tabela 12 – Conversão da dose animal para DHE baseado em ASC	130
Tabela 13 – Efeito do alho em pó liofilizado nas dietas normolipídicas e hiperlipídicas em relação ao peso corpóreo, ganho de peso e consumo da ração nos grupos de ratos	132
Tabela 14 – Concentrações plasmáticas de colesterol total, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicérides dos animais alimentados com dietas normolipídicas e hiperlipídicas	133

Tabela 15 – Efeito do alho em pó liofilizado nas dietas normolipídicas e hiperlipídicas em relação à concentração de glicose no plasma em ratos	136
Tabela 16 – Composição das dietas experimentais	148
Tabela 17 – Conversão da dose animal para DHE baseado em ASC	156
Tabela 18 – Efeito do alho em pó liofilizado nas dietas normolipídicas e hiperlipídicas em relação ao peso corpóreo, ganho de peso e consumo da ração nos grupos de ratos (CEF)	158

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT = alanina-aminotransferase

AMS = Alil Metil Sulfido

ANVISA = Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AOAC = Association of Official Analytical Chemists

AST = aspartato-aminotransferase

BHT = Butil-hidróxitolueno

CACH = dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang

CAP = dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano

CEF = Com esforço físico

CLAE = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

COS = Compostos organossulfurados

CPK = Creatino Fosfoquinase

CPK-BM = Creatino Fosfoquinase de Banda Muscular

DADS = Dialil dissulfeto

DCV = Doenças cardiovasculares

EMBRAPA = Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária

FAO = Food and Agriculture Organization

HDL-Colesterol = Lipoproteínas de alta densidade

HLPCH =dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang

HLPP =dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano

HPLC = dieta controle hiperlipídica

IAL = Instituto Adolfo Lutz

IAM = Infarto agudo do miocárdio

LDH = Lactato desidrogenase

ROS = Espécies reativas de oxigênio

SAC = S-allil cisteína

SEF = Sem esforço físico

TGO = glutâmico-oxalacética

TGP = transaminase glutâmico-pirúvica

USDA = United States Department of Agriculture

VLDL-colesterol = Lipoproteínas de densidade muito baixa

SUMÁRIO

Item	pág.
Lista de Figuras	xii
Lista de Tabelas	xv
Lista de Abreviaturas	xvii
1. PARTE I – GERAL	24
1.1 INTRODUÇÃO	24
1.2 REVISÃO DE LITERATURA	26
1.2.1 Substâncias Bioativas em Alimentos	26
1.2.2 Alho	28
1.2.2.1 História	28
1.2.2.2 Variedades cultivadas no Brasil	29
1.2.2.3 Cultivo	29
1.2.2.4 Vida de prateleira	30
1.2.2.5 Compostos organossulfurados presentes no alho	31
1.2.2.5.1 Alho fresco inteiro	32
1.2.2.6 Composição Química do Alho	32
1.2.2.7 Modificações Químicas no Alho	34
1.2.2.7.1 Alho picado ou macerado	36
1.2.2.7.2 Alho prensado	37
1.2.2.7.3 Alho macerado com óleo	37
1.2.2.7.4 Alho desidratado em pó	37
1.2.2.8 Atividade Antioxidante	38
1.2.3 Efeitos relacionados à ingestão de compostos organossulfurados	42
1.2.3.1 Biodisponibilidade dos compostos do alho	42
1.2.3.2 Efeitos benéficos à saúde	43
1.2.3.2.1 Propriedades contra doenças cardiovasculares	44
1.2.3.2.1.1 Infarto agudo do miocárdio – IAM	46
1.2.3.2.1.2 Propriedade antiesclerótica	48
1.2.3.2.2 Atividade antimicrobiana	49
1.2.3.2.3 Propriedades anticâncerígenas	50
1.2.3.3 Legislação	51

1.2.3.4 Efeitos Adversos	51
1.3 OBJETIVOS	52
1.3.1 Gerais	52
1.3.2 Específicos	52
1.4 MATERIAIS E MÉTODOS (“IN VITRO”)	53
1.4.1 Materiais	53
1.4.1.1 Amostras de alho	53
1.4.2 Métodos	53
1.4.2.1 Seleção, classificação e armazenamento dos bulbos de alho	53
1.4.2.2 Processamento do alho liofilizado	54
1.4.2.3 Amostras para vida de prateleira	54
1.4.2.4 Caracterização Físico-Química	54
1.4.2.4.1 Determinação do teor de umidade	55
1.4.2.4.2 Determinação de sólidos solúveis (°Brix)	55
1.4.2.4.3 Determinação de acidez titulável	55
1.4.2.4.4 Determinação de pH	55
1.4.2.4.5 Obtenção do extrato etanólico de alho	56
1.4.2.4.6 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ ácido linoléico	57
1.4.2.4.7 Determinação do resíduo seco do extrato	58
1.4.2.4.8 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais	59
1.4.2.4.9 Determinação do teor de alicina	60
1.4.2.4.9.1 – Preparo e determinação da síntese de alicina (a ser utilizada como padrão cromatográfico)	61
1.4.2.4.10 Delineamento Experimental	62
1.4.2.4.11 Análise Estatística	63
1.5 MATERIAIS E MÉTODOS (“IN VIVO”)	63
1.5.1 Materiais	63
1.5.1.1 Amostras para pesquisa animal	63
1.5.1.2 Tratamentos	64
1.5.1.3 Grupos de estudo	65
1.5.1.3.1 Experimento sem esforço físico	65
1.5.1.3.2 Experimento com esforço físico	66
1.5.2 Métodos	67

1.5.2.1 Dietas	67
1.5.2.2 Preparo das amostras de alho	69
1.5.2.3 Procedimento Experimental	69
1.5.2.3.1 Experimento sem esforço físico	69
1.5.2.3.2 Experimento com esforço físico	71
1.5.2.4 Dosagens Bioquímicas	73
1.5.2.5 Delineamento estatístico	74
1.5.2.6 Considerações Éticas	74
2. PARTE II – EXPERIMENTOS “IN VITRO”	75
2.1 CAPÍTULO 1 – Síntese de Alicina por oxidação acompanhada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)	75
2.1.1 Introdução	76
2.1.2 Material e Métodos	78
2.1.2.1 Material	78
2.1.2.2 Metodologia para síntese de alicina	79
2.1.2.3 Análise cromatográfica	79
2.1.2.4 Curva padrão	80
2.1.2.5 Determinação da pureza	81
2.1.3 Resultados e Discussão	81
2.1.4 Conclusão	84
2.1.5 Referências Bibliográficas	85
2.2 CAPÍTULO 2 – Caracterização físico-química e funcional do alho fresco e liofilizado	87
2.2.1 Introdução	88
2.2.2 Material e Métodos	90
2.2.2.1 Material	90
2.2.2.2 Métodos	90
2.2.3 Resultados e Discussão	91
2.2.4 Conclusão	100
2.2.5 Referências Bibliográficas	101
2.3 CAPÍTULO 3 – Determinação físico-química e de compostos funcionais em alhos frescos nacionais e importados da China durante o armazenamento refrigerado.	106
2.3.1 Introdução	107

2.3.2 Material e Métodos	109
2.3.2.1 Material	109
2.3.2.2 Métodos	110
2.3.2.2.1 Determinação físico-química	110
2.3.2.2.2 Determinação do teor de alicina	110
2.3.2.2.3 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico	110
2.3.2.2.4 Determinação de compostos fenólicos totais	111
2.3.2.2.5 Delineamento experimental	111
2.3.3 Resultados e Discussão	111
2.3.4 Conclusão	118
2.3.5 Referências Bibliográficas	119
3. PARTE III – EXPERIMENTOS “IN VIVO”	123
3.1 CAPÍTULO 4 – Efeito do alho em pó sobre o metabolismo lipídico em ratos hiperlipidêmicos	123
3.1.1 Introdução	125
3.1.2 Material e Métodos	126
3.1.2.1 Amostra	126
3.1.2.2 Processamento do alho em pó liofilizado	126
3.1.2.3 Determinação do teor de alicina	127
3.1.2.4 Animais	127
3.1.2.5 Dietas	127
3.1.2.6 Procedimento Experimental – Sem esforço físico (SEF)	128
3.1.2.7 Análises enzimáticas	129
3.1.2.8 Transformação da dosagem do estudo animal para o humano	129
3.1.2.9 Delineamento experimental	130
3.1.3 Resultados e Discussão	131
3.1.3.1 Teor de alicina	132
3.1.3.2 Efeito do alho em pó no peso corpóreo	133
3.1.3.3 Concentrações plasmáticas	134
3.1.3.4 Efeito do alho em pó nos níveis de colesterol total	134
3.1.3.5 Efeito do alho em pó nos níveis de HDL-colesterol	134
3.1.3.6 Efeito do alho em pó nos níveis de VLDL-colesterol e Triglicerídeos	135

3.1.3.7 Efeito do alho em pó nos níveis de glicose	135
3.1.3.8 Transformação da dosagem do estudo animal para o humano	137
3.1.4 Conclusão	137
3.1.5 Referências Bibliográficas	138
3.2 CAPÍTULO 5 – Estudo em ratos do efeito do alho em pó no infarto agudo do miocárdio	142
3.2.1 Introdução	144
3.2.2 Material e Métodos	146
3.2.2.1 Amostra	146
3.2.2.2 Processamento do alho em pó liofilizado	147
3.2.2.3 Determinação do teor de alicina	147
3.2.3.4 Animais	147
3.2.3.5 Dietas	148
3.2.3.6 Procedimento Experimental	149
3.2.3.6.1 Com esforço físico (CEF)	149
3.2.3.6.2 Sem esforço físico (SEF)	151
3.2.3.7 Dosagens bioquímicas associadas ao IAM	151
3.2.3.7.1 Creatinoquinase (CK) ou Creatinofosfoquinase (CPK)	152
3.2.3.7.2 Creatinoquinase fração MB (CK-MB)	152
3.2.3.7.3 Lactato Desidrogenase (LDH)	153
3.2.3.7.4 Transaminase glutâmico oxalacética (TGO)	153
3.2.3.7.5 Transaminase glutâmico pirúvica (TGP)	154
3.2.3.8 Dosagens bioquímicas associadas ao metabolismo lipídico	154
3.2.3.9 Análises enzimáticas	155
3.2.3.10 Transformação da dosagem do estudo animal para o humano	155
3.2.3.11 Delineamento experimental	156
3.2.4 Resultados e Discussão	156
3.2.4.1 Teor de alicina	156
3.2.4.2 Efeito do alho em pó no peso corpóreo	157
3.2.4.3 Efeito do alho em pó nas dosagens bioquímicas associadas ao IAM	159
3.2.4.3.1 CK	159
3.2.4.3.2 CK-MB	160
3.2.4.3.3 LDH	161

3.2.4.3.4 TGO	162
3.2.4.3.5 TGP	163
3.2.4.4 Dosagens bioquímicas associadas ao metabolismo lipídico	166
3.2.4.4.1 Colesterol Total	166
3.2.4.4.2 HDL-Colesterol	167
3.2.4.4.3 VLDL-Colesterol	168
3.2.4.4.4 Triglicerídeos	169
3.2.4.4.5 Glicose	170
3.2.4.5 Transformação da dosagem do estudo animal para o humano	173
3.2.5 Conclusão	173
3.2.6 Referências Bibliográficas	175
4. CONCLUSÃO GERAL	181
4.1 Estudo “in vitro”	181
4.2 Estudo “in vivo”	182
4.3 Sugestões	183
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS - GERAL	184
6. ANEXOS	204

1. PARTE I - GERAL

1.1 INTRODUÇÃO

A saúde humana está intimamente ligada à dieta. Desde a década de 90, equipe de pesquisadores nas áreas da epidemiologia, nutrição, oncologia, bioquímica e microbiologia têm demonstrado os importantes efeitos na saúde dos alimentos de origem vegetal. Evidências epidemiológicas sugerem que o consumo de hortaliças reduz o risco de câncer e de doenças cardiovasculares, o que é atribuído à presença de compostos bioativos com propriedades antioxidantes encontrados nestes alimentos (DREOSTI, 2000; NATIONAL ACADEMY PRESS, 2000).

"Substâncias bioativas" são constituintes extra-nutricionais que ocorrem tipicamente em pequenas quantidades nos alimentos. Seus efeitos na saúde estão sendo intensivamente avaliados. Estas substâncias variam amplamente em estrutura química e função, dentre eles estão compostos fenólicos, incluindo sua subcategoria os flavonóides; fitoestrógenos; compostos organossulfurados (COS); fibras solúveis; isotiocianatos e monoterpenos (STRINGHETA *et al.*, 2007; KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002; KITS, 1994).

Os danos oxidativos, induzidos nas células por radicais livres e oxidantes não-radicaais, são relacionados com a etiologia de várias doenças, como as cardiopatias, aterosclerose, câncer, problemas pulmonares, diabetes, catarata, processos inflamatórios além do envelhecimento, por diferentes mecanismos (BIANCHI & ANTUNES, 1999; TAPIERO *et al.*, 2004). Fitoquímicos presentes em dietas ricas em alimentos vegetais, incluindo COS do alho (*Allium sativum* L.) e polifenóis da cebola (*Allium cepa* L.), provêm uma potente atividade biológica na proteção contra danos oxidativos (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002; TAPIERO *et al.*, 2004). Estas substâncias atuam evitando a formação de radicais livres por meio da reação com os produtos iniciais da oxidação lipídica; quelando os metais pesados (catalisadores das reações de oxidação) ou desativando a molécula de oxigênio singleto e assim evitando a formação de hidroperóxidos (POLLONIO, 2000).

A alicina é o composto ativo mais comum do alho, representando cerca de 70% dos compostos sulfurados presentes neste bulbo. É produzida pela interação do aminoácido não protéico aliina [(+)-S-allil-L-sulfóxido cisteína], abundante nos

dentos de alho, com a enzima aliinase e sua formação é influenciada pela moagem do alho, durante o processo de secagem, pela temperatura que o alho é seco, e pela umidade, além de diferenças varietais e de tratos culturais (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002; MIRON *et al.* 2002; BAGHALIAN *et al.*, 2005).

As respostas fisiológicas do alho têm sido amplamente atribuídas à redução de fatores de riscos para doenças cardiovasculares e câncer, estímulo da função imune, aumento da detoxificação de compostos estranhos, proteção hepática, efeito antimicrobiano e efeito antioxidante (EL-DEMERDASH *et al.*, 2005).

Nas capitais brasileiras, entre 1930 e 1980, a mortalidade relacionada às doenças cardiovasculares cresceu de 12 para 31%. No período de 1990 a 1994, os indicadores evidenciaram um aumento para 34%, proporcionalmente maior em mulheres. Mais recentemente, Indicadores e Dados Básicos para a Saúde do Brasil (IDB, 2008), fornecidos pelo Ministério da Saúde, demonstraram que as doenças do aparelho circulatório ainda são as que mais matam em nosso país, sendo que 32% dos óbitos estão relacionados a estas doenças, apesar de se apresentarem em menores percentuais, quando comparados ao período de 1994 a 1999 (FARRET, 2005).

Atualmente, as doenças cardiovasculares representam 10% das internações, as quais equivalem a 17% dos gastos do SUS - Sistema Único de Saúde. Segundo o Ministério da Saúde, são as responsáveis por 24% das aposentadorias por invalidez (FARRET, 2005).

Os efeitos benéficos a saúde devido a ingestão de antioxidantes têm aumentado o interesse de fabricantes de alimentos por esses compostos, o que contribui para a elevação dos estudos acerca do conteúdo, estrutura e estabilidade de diferentes antioxidantes presentes nos alimentos (EWALD *et al.*, 1999).

A importância econômica da cultura do alho tem aumentado sensivelmente nos últimos anos, não só pelo seu uso generalizado como condimento, mas também por algumas qualidades terapêuticas que a ele são atribuídas. A produção nacional de alho, no ano de 2007, foi de aproximadamente 84 mil toneladas. Essa quantidade coloca o país como o 15º maior produtor mundial da hortaliça (OLIVEIRA *et al.*, 2003, 2004; BAGHALIAN *et al.*, 2005; FAOS, 2009).

Diante deste cenário e de estudos já realizados mundialmente mostrando o efeito fisiológico como atividade antiesclerótica, o presente trabalho teve como objetivo central determinar a influência do processamento e armazenamento nas

propriedades químicas, físicas e funcionais em diferentes cultivares de alho (estudo “in vitro”) e avaliar os efeitos fisiológicos dos compostos funcionais sobre o metabolismo lipídico e o infarto agudo do miocárdio - IAM (estudo “in vivo”).

1.2 REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 Substâncias Bioativas em Alimentos

As substâncias bioativas são reconhecidas pelas suas propriedades benéficas à saúde humana, atuando diretamente na prevenção e tratamento de doenças. Nos alimentos estão distribuídos em frutas, hortaliças, cereais, peixes de água fria, dentre outros (Tabela 1).

Tabela 1 – Principais substâncias bioativas presentes nos alimentos

Substâncias Bioativas	Exemplos	Fontes
Flavonóides		
Flavonóis	Quercetina, Campferol e catequina	Cebola, maçã, azeitona, brócolis, alface, vinho tinto, cacau/chocolate
Flavanas	Epicatequina, epigallocatequina, galato - 3-epigallocatequina, galato-3-epigallocatequina	Chá verde/preto, cacau/chocolate
Fitoestrógenos		
Lignana, coumestrona	Enterolactona, enterodiol, coumestrol	Óleo de sementes de flax e alfafa.
Isoflavonas	Genisteína, daidzeína	Soja, leguminosas
Resveratrol	–	Uva, vinho tinto, amendoim
Licopeno	–	Tomates, produtos a base de tomates

Tabela 1(continuação) – Principais compostos bioativos presentes nos alimentos

Substâncias Bioativas	Exemplos	Fontes
COS	Alicina, Dialil sulfeto, Dissulfeto de dialila , alil mercaptano	Alho, cebola, cebolinha
Fibras solúveis	β -glucana, psillium	pectina, Aveia, cevada, levedura, frutas, vegetais, semente de psillium, cereais e grãos fortificados
Isotiocianatos	Fenetil, sulforafanos	benzil, Agrião, brócolis
Monoterpenos	d-Limoneno, ácido perílico	Óleos essências de frutas cítricas, cereja, menta, ervas

Fonte: KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002.

Embora sejam benéficas, as substâncias bioativas não são considerados nutrientes, sendo substâncias que se destacam não pela função de nutrir, mas como componentes dos alimentos que influenciam atividades celulares e fisiológicas, resultando em efeitos benéficos à saúde, podendo agir como antioxidantes, inibidores e indutores de enzimas, inibidores de atividades receptoras, indutores e inibidores da expressão de genes, entre outras. A demonstração destas atividades por si só não é suficiente para o composto ser definido como uma substância bioativa, pois ele deve ter também um efeito benéfico associado à saúde (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2004).

A legislação brasileira define alegação de propriedade funcional e alegação de propriedade de saúde e para apresentarem tais alegações tanto os alimentos como as substâncias bioativas devem ser obrigatoriamente, registrados junto ao órgão competente (STRINGHETA *et al.*, 2007).

1.2.2 Alho

1.2.2.1 História

O alho é o membro da família das liliáceas, a qual contém mais de 700 espécies, incluindo cebola, alho poró e cebolinha, e tem o nome botânico de *Allium sativum* L. (HOLUB *et al.*, 2002). Suas propriedades benéficas têm sido reconhecidas há mais de 5000 anos. Na antiguidade, os babilônios, egípcios, fenícios, vikings, chineses, gregos, romanos e hindus utilizavam o alho com frequência, como remédio para distúrbio intestinal, flatulência, vermes, infecções respiratórias, doenças de pele, ferimentos e sintomas do envelhecimento. O alho continuou sendo utilizado durante a Idade Média até a Segunda Guerra Mundial, para tratar feridas superficiais dos soldados, tirado da terra, cortado em fatias e aplicado diretamente nas feridas, para inibir a propagação de infecções (AMAGASE *et al.*, 2001).

Pesquisa realizada por Louis Pasteur no século XVIII documentou que o alho matava bactérias. No século XIX, Dr Albert Schweitzer utilizou o alho para tratar cólera, tifo e desintéria amébrica enquanto ele estava trabalhando na África como missionário (BHAGYALAKSHMI *et al.*, 2005).

O alho adquiriu, assim, uma reputação no folclore de muitas culturas durante séculos, como um agente medicinal profilático e terapêutico. Muitos efeitos clínicos e experimentais favoráveis ao consumo de alho, incluindo extrato de alho, têm sido relatados. Essas respostas biológicas incluem redução de fatores de risco para doenças cardiovasculares e câncer, estímulo da função imune, aumento da detoxificação de compostos estranhos, restauração da força física, resistência para diferentes estresses e efeitos anti-envelhecimento (AMAGASE *et al.*, 2001).

No Brasil, o alho chegou junto com os portugueses, na época do descobrimento. A sua cultura é muito importante, devido à área cultivada e à geração de mão-de-obra, fazendo com que a cultura figure entre as principais hortaliças cultivadas no país (ANAPA, 2009a; MOTA *et al.*, 2005). A importação de alho da China e da Argentina completa nossa necessidade interna de consumo. Em 2006, o Brasil importou da China, 63 mil toneladas e da Argentina, 56 mil toneladas (AGRIANUAL, 2008). Os preços baixos do alho importado da China e Argentina têm

dificultado a atividade no Brasil, motivo pelo qual tem diminuído a produção nacional e aumentado às importações (ANAPA, 2009).

A produção mundial de alho em 2006 foi estimada em aproximadamente 15 milhões toneladas, sendo a China o maior produtor mundial de alho, seguido da Índia, Coréia do Sul, Rússia e Estados Unidos (AGRIANUAL, 2008; FAOS, 2009).

1.2.2.2 Variedades cultivadas no Brasil

Há uma razoável quantidade de cultivares brasileiras de alho com qualidade equiparável aos melhores alhos importados. As cultivares variam quanto ao aspecto morfológico da planta, aos bulbos, à precocidade, suscetibilidade a doenças, pseudo-perfilhamento (brotação lateral resultante do crescimento das folhas protetoras dos dentes) e ocorrência de “palitos” ou bulbilhos (dentes) pequenos, que pesam menos de um grama, sendo normalmente rejeitados pelo consumo e não sendo adequados ao plantio.

As cultivares nacionais que apresentam melhores características comerciais são dois grupos (EMBRAPA, 2004):

- 1- Comum: Amarante, Gigante Lavínia, Gigante Roxo e Gravatá;
- 2- Nobre: Caçador, Quitéria, Jonas e Chonan.

1.2.2.3 Cultivo

As exigências climáticas para o cultivo do alho, principalmente temperatura e fotoperíodo, variam conforme as cultivares. Para o alho comum o fotoperíodo (FP) deve ser superior a 9 horas e para o alho nobre superior a 13 horas, sendo a temperatura ideal na faixa de 10 a 15°C. As plantas desenvolvem-se melhor em solos leves e ricos em matéria orgânica. Solos muito argilosos deformam os bulbos e dificultam a colheita. Solos arenosos não têm suficiente poder de retenção da umidade e dos nutrientes (EMBRAPA, 1997).

Durante o armazenamento de alho ocorrem perdas de massa e alterações na composição físico-química dos bulbos, estando estas alterações relacionadas à transpiração, à atividade respiratória, ao brotamento, doenças causadas por fungos, bactérias e vírus, ao ataque de pragas na fase pós-colheita, na cura e no armazenamento. No início da fase de cura pós-colheita de bulbos, ocorre maior

perda de massa, a qual diminui gradualmente com o decorrer da estocagem. Outro indicador da capacidade de conservação do alho é o grau de chochamento. De modo geral, as cultivares com menor número de bulbilhos por bulbo, tem maior perda de bulbilhos por chochamento, que são influenciados pelos seguintes fatores: genéticos, adubação, cura e armazenamento (EMBRAPA, 1997; Oliveira *et al.*, 2004).

1.2.2.4 Vida de prateleira

Os bulbos de alho são estocados por muitos meses depois da colheita para assegurar o fornecimento o ano todo para os clientes. As condições de estocagem são importantes para prevenir perdas de qualidade e vida de prateleira, como descoloração da superfície, perda de umidade, germinação e enraizamento. Em particular, a temperatura de estocagem afeta a quebra de dormência e germinação da semente e desenvolvimento de raiz (CANTWELL *et al.*, 2003).

TAKAGI (1979) demonstrou que a germinação e o enraizamento em bulbos de alho podem ser suprimidos durante a estocagem à -2°C . VOLK *et al.* (2004) relataram que as características de qualidade como a firmeza e o sabor foram mantidos quando os bulbos de alho foram estocados à -3°C por 9 meses. Também tem sido relatado que a temperatura ótima para indução da germinação e enraizamento é aproximadamente 4°C (AOBA & TAKAGI, 1971; TAKAGI, 1979). Entretanto, todos os estudos acima citados foram meramente observações morfológicas e não combinaram com dados analíticos químicos. Somente LAWSON *et al.* (1991) relataram mudanças nos conteúdos dos dois maiores COS, γ -L-glutamil-S-alil-L-cisteína e γ -L-glutamil-S-(trans-1-propenil)-L-cisteína, quando bulbos de alho foram estocados a 4°C . Os dados sugerem que o conteúdo dos COS no alho varia de acordo com diferentes condições de estocagem e que isto pode ser um dos fatores importantes para controlar a qualidade e atividade biológica do alho.

ICHIKAWA *et al.* (2006) avaliaram mudanças no conteúdo de três γ -glutamil peptídeos e quatro sulfóxidos em bulbos de alho durante a estocagem à -3 , 4 e 23°C por 150 dias. Os dados sugerem que houve uma diminuição no γ -glutamil peptídeos e aumento nos sulfóxidos em todas as temperaturas. O conteúdo de ciclo aliina aumentou durante a estocagem em temperaturas altas.

HUGHES *et al.* (2006) avaliaram os níveis de compostos organossulfurados (aliina, isoaliina, γ -glutamil alil cisteína sulfóxido e γ -glutamil isoalil cisteína sulfóxido) em dentes de alho estocados a temperatura ambiente (25°C) e a 4°C por 42 e 180 dias, respectivamente. Observou-se que não houve mudanças nos níveis de aliina, o maior precursor do sabor do alho, em dentes estocados a 4°C e a temperatura ambiente. Entretanto, isoalliina aumentou significativamente durante a estocagem a 4°C e os dois γ -glutamil peptídeos diminuíram a suas concentrações. A consequência importante da estocagem a baixas temperaturas pelo alho é que a concentração de aliina é mantida. Este composto contribui para o sabor de alho fresco e em suas propriedades farmacológicas sendo mantidas no alho em pó e no extrato.

1.2.2.5 Compostos organossulfurados presentes no alho

O alho contém 33 COS, sendo que 1 g de alho fresco contém de 11 a 35 mg destes compostos. O alho possui quase quatro vezes mais COS (por grama de peso fresco) do que a cebola, brócolis, couve-flor e damasco (HOLUB *et al.*, 2002).

A alicina (dialil tiosulfonato) é um líquido volátil responsável pelo odor pungente do alho; quimicamente é uma molécula instável e altamente reativa. No alho é o composto ativo mais comum e representa cerca de 70% dos compostos sulfurados presentes neste bulbo. Quando os bulbos de alho são cortados ou esmagados, a alicina é produzida enzimaticamente pela interação do aminoácido não protéico aliina [(+)-S-allil-L-sulfóxido cisteína], abundante nos dentes de alho, com a enzima aliinase (Figura 1). Durante a reação enzimática, amônio e piruvato também são formados. Os elementos responsáveis pela perda da alicina são: o ar, a água e a alta temperatura (MIRON *et al.*, 2002; MIRON *et al.*, 2004; BAGHALIAN *et al.*, 2005; SANCE *et al.*, 2006).

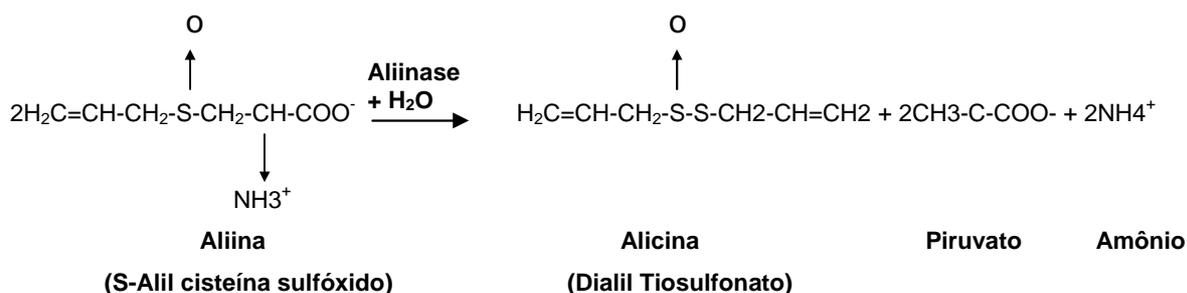


Figura 1 - Transformação da aliina em alicina por via enzimática (LI *et al.*, 2007).

1.2.2.5.1 Alho fresco inteiro

Os COS dos dentes de alho intactos são cisteínas sulfóxidos (principalmente aliina, e em menor quantidade metiina e isoaliina), γ - glutamilsteínas (principalmente γ -glutamilst-S-trans-1-propenil-cisteína e, em menor quantidade, γ -glutamilst-S-alilcisteína e γ -glutamilst-S-metilcisteína). Juntos, equiparam-se em peso e representam aproximadamente 95% de enxofre total no alho ou até 20 mg/g de alho (HOLUB *et al.*, 2002).

No bulbo de alho, durante a brotação, germinação e armazenamento, uma parcela de γ -glutamilsteínas é convertida em sulfóxidos de cisteína. Aliina é o composto mais abundante dos sulfóxidos de cisteína (5-14 mg/g), seguido pela metiina (0,5-1,5 mg/g), isoaliina (0,2-1,2 mg/g) e cicloaliina (0,5-1,2 mg/g) (HERBAL CHEMISTRY, 2007).

1.2.2.6 Composição Química do Alho

A composição química do alho é bastante diversa e complexa resultando em alta variabilidade na qualidade de produtos de alho, em consequência do seu processo de fabricação. O descascamento do alho, bem como o processamento do óleo ou pó do alho, pode aumentar o número e variedade de compostos ativos (BHAGYALAKSHMI *et al.*, 2005).

A composição centesimal do alho encontra-se nas tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Composição centesimal do alho cru nacional da espécie *Allium sativum*.

Nutrientes	Valor por 100 g
Umidade (g)	68,11
Energia (Kcal)	113
Energia (KJ)	473
Proteínas (g)	5,54
Lipídeos totais (g)	0,20
Carboidratos totais (g)	24,64
Carboidratos “disponíveis” (g)	22,13
Cinzas (g)	1,51
Fibra alimentar total (g)	2,51

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (2008)

Tabela 3 – Composição química do alho cru (*Allium sativum*).

Nutrientes	Valor por 100 (g)
Água (g)	58,58
Proteínas (g)	6,36
Gordura (g)	0,5
Colesterol (mg)	0
Gordura saturada (g)	0,089
Carboidratos (g)	33,06
Fibra total dietética (g)	2,1
Cinzas (g)	1,5
Cálcio (mg)	181
Ferro (mg)	1,7
Magnésio (mg)	25
Fósforo (mg)	153
Potássio (mg)	401
Sódio (mg)	17
Zinco (mg)	1,16
Cobre (mg)	0,299
Manganês (mg)	1,672
Selênio (mcg)	14,2
Vitamina C (mg)	31,20
Tiamina (mg)	0,2
Riboflavina (mg)	0,11
Niacina (mg)	0,70
Ácido pantotênico (mg)	0,596
Vitamina B6 (mg)	1,235
Folato total (mcg)	3
Vitamina B12 (mcg)	0
Vitamina A (UI)	0
Valor calórico (Kcal)	149

Fonte: USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21 (2008).

Tabela 3 (continuação) – Composição química do alho cru (*Allium sativum*).

Nutrientes	Valor por 100 (g)
Aminoácidos	
Triptofano	0,066
Treonina	0,157
Isoleucina (g)	0,217
Leucina (g)	0,308
Lisina (g)	0,273
Metionina (g)	0,076
Fenilalanina (g)	0,183
Tirosina (g)	0,081
Valina (g)	0,291
Arginina (g)	0,634
Histidina (g)	0,113
Alanina (g)	0,132
Ácido Aspártico (g)	0,489
Ácido Glutâmico (g)	0,805
Glicina (g)	0,200
Prolina (g)	0,100
Serina (g)	0,190

Fonte: USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 21 (2008).

Segundo SHOBAHALAN & ARUMUGAM (1991), durante o desenvolvimento do bulbo, os conteúdos de N, P, K, Ca e Mg diminuíram nas folhas e raízes, mas aumentaram nos bulbos. Os bulbos contêm uma alta porcentagem de açúcares redutores e não redutores e proteínas em relação às outras duas partes.

1.2.2.7 Modificações Químicas no Alho

As modificações químicas que ocorrem no alho são bastante complexas e provavelmente desenvolvidas como um mecanismo de segurança e proteção contra microorganismos e outras injúrias. Os constituintes primários contendo compostos sulfurados no alho intacto são γ -glutamyl-S-alkyl (en)-L-cisteínas e S-alkyl (en)-L-cisteínas sulfóxido, incluindo aliina. Os bulbos de alho intactos contêm alta quantidade de γ -glutamylcisteínas. Este composto de reserva pode ser hidrolisado e

oxidado para formar aliina, na qual é acumulado naturalmente durante a estocagem dos bulbos de alho a temperaturas baixas. Uma vez o alho sendo processado, como cortado ou esmagado, compostos no alho intacto são convertidos em centenas de COS em um pequeno período de tempo. Quando o alho é atacado por microorganismos, esmagado, cortado ou mastigado, ou quando é desidratado, pulverizado e então exposto a água, a enzima vacuolar, aliinase, rapidamente quebra a cisteína sulfóxido em alicina. Alicina e outros tiosulfonatos instantaneamente se decompõem em outros compostos, como dialil sulfeto (DAS), dissulfeto de dialila (DADS) e dialil trissulfeto (DAT), ditiinas e ajoeno. Ao mesmo tempo, γ -glutamilcisteínas são convertidas para S-alilcisteína (SAC), utilizando uma outra via (Figura 2) (AMAGASE *et al.*, 2001).

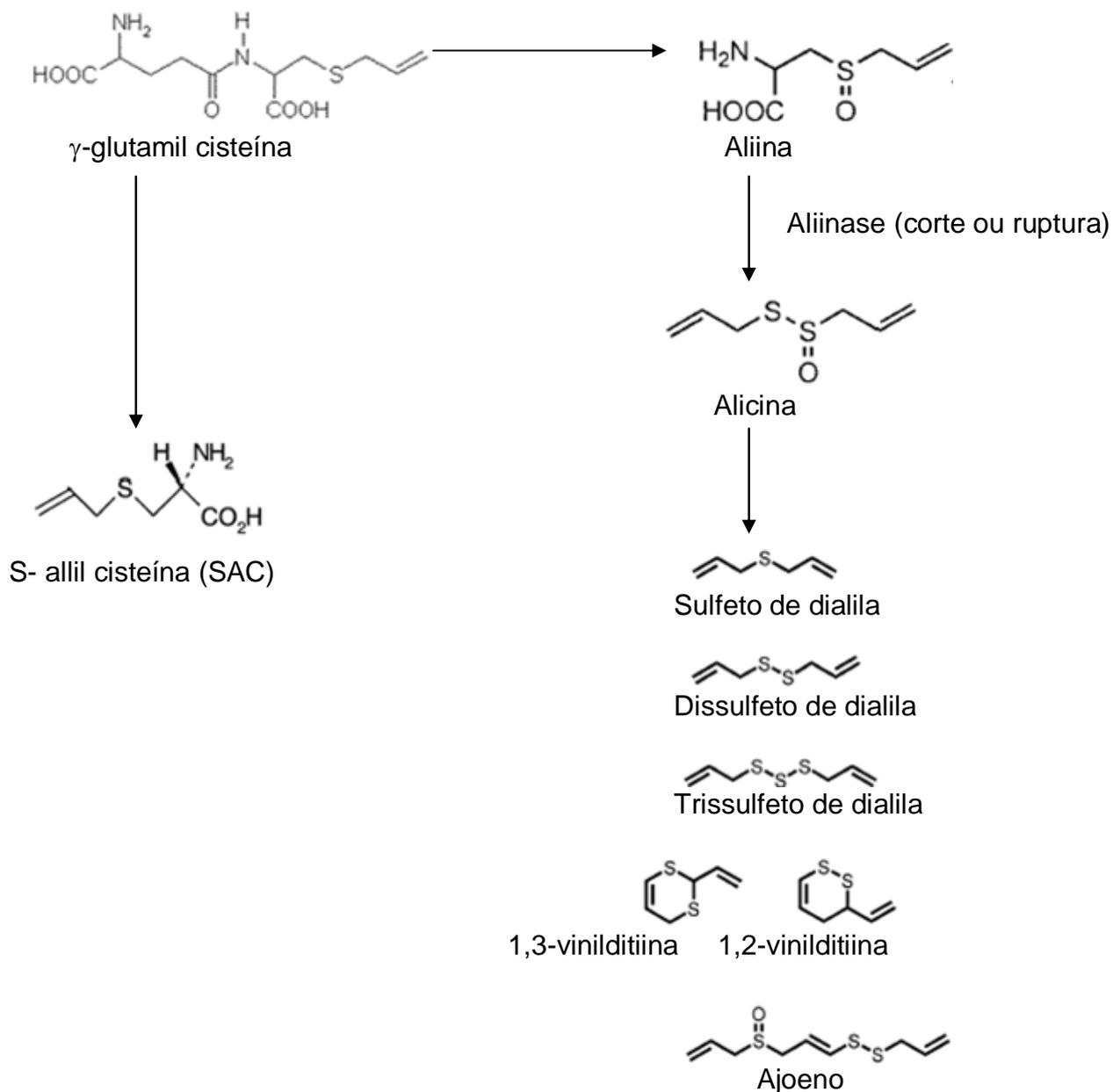


Figura 2 – Modificações químicas no alho (*Allium sativum* L.) (AMAGASE *et al.*, 2001).

Durante a estocagem dos bulbos de alho a temperaturas baixas, a aliina é acumulada naturalmente. Em média, um bulbo de alho contém acima de 0,9% de γ -glutamil cisteínas e acima de 1,8% de aliina (AMAGASE *et al.*, 2001).

1.2.2.7.1 Alho picado ou macerado

Quando o alho é mecanicamente danificado (picado ou macerado), as paredes celulares dos dentes de alho são rompidas, colocando em contato cisteínas

sulfóxidos com a enzima aliinase, até então armazenada em separado. Em poucos segundos as cisteínas sulfóxidos, com exceção da cicloallina, são convertidas em ácidos sulfênicos intermediários que rapidamente se combinam para formar oito dialquil sulfinotioatos (HERBAL CHEMISTRY, 2007).

1.2.2.7.2 Alho prensado

Quando o alho é prensado, os sulfinotioatos transformam-se espontaneamente em sulfetos, principalmente, trissulfeto de dialila ou 1,3-dialiltrissulfano; dissulfeto de dialila ou 1,2-dialildissulfano e alil metil trissulfeto ou 1-alil-3-metiltrissulfano (HERBAL CHEMISTRY, 2007).

1.2.2.7.3 Alho macerado com óleo

Produtos de alho macerado no óleo são produzidos pela homogeneização do alho picado em óleo vegetal, seguido pela separação de componentes insolúveis em óleo. Os tiosulfonatos produzidos durante esse processo são muito solúveis em óleo e se transformam subsequentemente em vinilditiinas (70%), sulfidos (18%) e ajoenos (12%) (HOLUB *et al.*, 2002). Estudos atribuem esses compostos a atividade anti-trombótica (LAWSON & HUGHES, 1992).

1.2.2.7.4 Alho desidratado em pó

Para produção do alho desidratado em pó, bulbos de alho podem ser cortados, esmagados, secos e pulverizados, podendo conservar os mesmos compostos que o alho fresco, entretanto, as quantidades e proporções de vários constituintes diferem significativamente. Por exemplo, o principal COS presente em ambos, alho cru e alho em pó, é a aliina. Em média, bulbos de alho contêm aproximadamente 0,8% de aliina. O processo de desidratação puro, com nenhuma perda dos compostos, poderia resultar em 0,20-0,25% de aliina no pó. Entretanto, alho em pó contém somente 0,1% de aliina, indicando que mais da metade da aliina é perdida durante a desidratação (AMAGASE *et al.*, 2001).

No alho em pó, a conversão da aliina para alicina começa quando a água é adicionada ao pó. Então, a alicina rapidamente se degrada em dissulfeto de dialila

(DADS), vinilditiinas e ajoenos. A formação de subprodutos depende da concentração, temperatura e pH em que a adição de água ocorre (ARNAULT *et al.*, 2005).

Alho homogeneizado em *spray-dryer* resulta em perda da enzima aliinase e o alho fatiado, seco em forno com fluxo de ar, a baixas temperaturas (<60°C), tem pouco efeito na produção dos principais tiosulfonatos (alicina e alil-metil-tiosulfonato). De acordo com HOLUB *et al.*(2002), a secagem em temperaturas muito altas resulta em perda irreversível da atividade da enzima aliinase.

Alho cortado desidratado pelo processo de liofilização possui uma excelente qualidade, além de manter a pungência do produto com menor perda do ácido pirúvico, porém, é um dos processos mais caros devido ao alto custo de operação (SANCE *et al.*, 2006; LI *et al.*, 2007).

Aliina e aliinase são muito estáveis quando secas. Portanto, o alho em pó tem o potencial de preservar a capacidade de liberação de alicina. Há grande variabilidade no teor de alicina em alho em pó, dependendo da cultivar e métodos de secagem utilizados (LAWSON *et al.*, 1991).

1.2.2.8 Atividade Antioxidante

Dietas ricas em frutas e hortaliças têm sido associadas com a diminuição de riscos de muitas doenças crônicas, como doenças cardiovasculares e alguns tipos de câncer. Estes efeitos protetores têm sido atribuídos particularmente a vários compostos antioxidantes presentes em frutas e hortaliças, por exemplo, vitaminas C e E, β -caroteno e polifenólicos (NUUTILA *et al.*, 2003).

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, por meio de um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais, reduzindo danos oxidativos no corpo humano. Eles podem ser sintéticos ou naturais e para serem utilizados em alimentos, devem ser seguros para a saúde. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes utilizados em alimentos e medicamentos são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno (NAMIKI, 1990; DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

O potencial de um composto antioxidante é determinado pela sua capacidade como um doador de elétrons ou hidrogênio, capacidade de deslocar ou estabilizar

um elétron desemparelhado, reatividade com outro antioxidante e reatividade com oxigênio molecular. Outros efeitos fisiológicos da ação de compostos antioxidantes são sua atuação como anticancerígenos e antimutagênicos sempre considerando que eles ocorram por ação de radicais livres. A formação de radicais livres está associada com o metabolismo normal de células aeróbicas. O consumo de oxigênio inerente à multiplicação celular leva a geração de uma série de radicais livres. A interação destas espécies com moléculas em excesso de natureza lipídica produz novos radicais: hidroperóxidos e diferentes peróxidos. Estes grupos de radicais podem interagir com os sistemas biológicos de formas citotóxicas (MORAES & COLLA, 2006).

Um radical livre é definido como qualquer átomo, grupo de átomos ou molécula com um elétron não-pareado ocupando uma órbita externa. O ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), o radical hidroxila ($\bullet OH$) e o óxido nítrico (NO^{\bullet}) são exemplos de radicais livres. Existem, entretanto, compostos igualmente reativos quanto os radicais livres que não possuem elétron não-pareado na última camada e, portanto, não podem ser classificados como radicais livres. Essas substâncias são classificadas de maneira mais ampla como espécies reativas de oxigênio (ROS) ou espécies reativas de nitrogênio (RNS) e incluem o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o cátion nitrosonium (NO^+) e o peroxinitrito ($ONOO^-$) (DRÖGE, 2002). No alho as modificações oxidativas de DNA, proteínas e lipídeos pelas ROS têm sido reconhecidas por possuírem um importante papel no envelhecimento e doenças incluindo, doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, inflamatórias e câncer. Extrato de alho envelhecido tem mostrado exercer ação pelo seqüestro ROS aumentando as enzimas antioxidantes celulares superóxido dismutase, catalase e glutadiona peroxidase e inibindo a peroxidação lipídica, assim protegendo as células endoteliais das injúrias pelas moléculas oxidativas, as quais contribuem para a aterosclerose (LANZOTTI, 2006).

A formação de radicais livres “in vivo” ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos (ozônio, radiações gama e ultravioleta, medicamentos, dieta de alta caloria e cigarro). Contudo, na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares pelos radicais

livres tem sido chamado de estresse oxidativo. A ocorrência de um estresse oxidativo moderado, frequentemente é acompanhada do aumento das defesas antioxidantes enzimáticas, mas a produção de uma grande quantidade de radicais livres pode causar danos e morte celulares (BIANCHI & ANTUNES, 1999).

O potencial antioxidativo de extratos vegetais e compostos puros podem ser medidos utilizando numerosos testes “in vitro”. Cada um desses testes é baseado em uma característica da atividade antioxidante, como a habilidade de seqüestrar radicais livres ou inibir a peroxidação lipídica. Entretanto, a atividade antioxidante total dos vegetais não pode ser avaliada por um simples método, devido à natureza complexa dos fitoquímicos (NUUTILA *et al.*, 2003).

Muitos estudos têm demonstrado propriedades antioxidantes do gênero *Allium* (YIN & CHENG, 1998b; KAUR & KAPOOR, 2002; NUUTILA *et al.*, 2003; TEPE *et al.*, 2005; QUEIROZ, 2006) e esta habilidade tem sido atribuída a presença de compostos organossulfurados e seus precursores.

Estudos conduzidos com extrato de alho têm mostrado a presença de duas classes principais de componentes antioxidantes, a saber, flavonóides e compostos contendo enxofre, dialil sulfeto e trissulfeto e alil-cisteína (LEELARUNGRAYUB *et al.*, 2006). Os autores relataram que os extratos de alho e cebolinha frescos, provenientes do mercado da Tailândia, inibiram a peroxidação lipídica e aceleraram as suas decomposições. Houve redução de peróxidos de proteínas para os mesmos extratos, demonstrando seu potencial em oferecer alguma proteção para os componentes das células como, DNA ou enzimas, na qual podem ser danificadas pelos peróxidos de proteínas. Extratos preparados com hexano desses vegetais apresentaram atividade antioxidante mais alta, seguido do extrato preparado com água e bulbos “pressionados” sendo obtidos por esmagamento, seguido da filtração do suco e liofilização do mesmo. O potencial antioxidante foi medido pela captura do radical livre ABTS^{•+} (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)).

OKADA *et al.* (2006) avaliaram o mecanismo antioxidativo e cinético da alicina como um antioxidante. Eles propuseram que o radical peroxil (ROO[•]) extrai um átomo de hidrogênio da alicina formando um radical alquil centrado no carbono na posição α para ser reduzido a um átomo enxofre, na qual por sua vez reage com outro radical ROO[•]. Observou-se no estudo a ação antioxidante da alicina contra a oxidação do cumeno e linoleato de metila (ML) em clorobenzeno, utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). Os hidroperóxidos formados durante

o processo da inibição oxidativa do ML, com seus correspondentes alcoóis, foram analisados. Também foram determinados o fator estequiométrico (n) e o número de radicais peroxil capturados por uma molécula antioxidante da alicina pela medida de reatividade com 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) em clorobenzeno. O valor n para a alicina foi aproximadamente 1. Alicina reage com radical peroxil derivado do cumeno e ML, com uma constante de inibição média ($k_{inh}=2,6 \times 10^3 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$ e $1,6 \times 10^5 \text{ M}^{-1}\text{s}^{-1}$) em clorobenzeno, respectivamente.

Testes animais têm mostrado que alicina (dialil tiosulfonato), em baixas concentrações, pode ser responsável pelas propriedades antioxidantes no alho (LAWSON, 1998a).

YIN & CHENG (1998a) estudaram a atividade antifúngica de bulbos de alho, alho verde, cebolinha e alho-poró (*Allium fistulosum* L.), e relataram que estes alimentos têm diferentes capacidades antifúngicas sendo afetados pelo aquecimento e tratamento com adição de ácido e sal. O aquecimento e adição de ácido e sal são frequentemente utilizados para preparação de alimentos e processamento de alimentos em geral, porém, nesse estudo, a atividade antifúngica dessas plantas foi afetada pelo aquecimento e/ou tratamento ácido.

No estudo realizado por YIN & CHENG (1998b), somente parte do gênero *Allium* possui atividade antioxidante no modelo lipossomo. Além da alicina, outros compostos podem estar envolvidos na determinação da atividade antioxidante, porque a concentração de alicina não foi fortemente correlacionada com a atividade antioxidante observada nesses alimentos. Tratamento a quente, tratamento ácido, ou tratamento combinado reduziu a atividade antioxidante ou aumentou a atividade pró-antioxidante destes alimentos vegetais.

SROKA (2006) testou a atividade anti-radical de alguns extratos de plantas entre elas, o alho. Foi utilizado o radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazila) como substrato e os extratos das plantas foram obtidos com metanol ou metanol-água (1:1). A unidade anti-radical (EAU_{515}) por 1 mg de extrato de alho foi considerada a mais baixa de todas as plantas avaliadas ($0,6 \pm 0,14$), possuindo baixo potencial anti-radical.

1.2.3 Efeitos relacionados à ingestão de compostos organossulfurados

1.2.3.1 Biodisponibilidade dos compostos do alho

Os princípios ativos no alho não têm sido completamente caracterizados. Supõe-se que a biodisponibilidade (quantidade e velocidade de absorção) de compostos organossulfurados tenha um papel importante em determinadas respostas biológicas para várias preparações de alho. S-allil cisteína (SAC) é um dos compostos organossulfurados solúveis em água e presente no alho. A sua concentração aumenta durante extração/envelhecimento (processo nos quais pedaços de alho cru são colocados em etanol (15-20%) por 20 meses). A farmacocinética do SAC é bem estabelecida, sendo detectado no plasma, fígado e rim depois da ingestão oral e rapidamente absorvida no trato gastrointestinal. Estudos em ratos indicaram a absorção de 0,5 horas à dose de 12,5 a 25 mg/kg e de 1 hora a dose de 50 mg/kg. N-acetil-SAC tem sido identificada como o metabólico do SAC na urina de cachorros e humanos, sugerindo sua possível transformação para N-acetiltransferase (NAGAE *et al.*, 1994).

Os COS do alho solúveis em óleo, incluindo alicina, sulfidos, ajoeno e vinilditinas, não foram encontrados no sangue e urina, mesmo depois do consumo em larga quantidade de alho (25 g) ou alicina pura (60 mg). O estudo demonstrou a irreversibilidade da inativação da enzima aliinase em pH baixo e a completa e imediata inibição da formação dos tiosulfonatos quando o pH foi menor do que 3,6. Todos os dipropenil tiosulfonatos foram formados em pH ótimo de 4,5-5,0 e todos os metil propenil e dimetil tiosulfonatos foram formados em pH 6,7-7,0 e pH 5,5, respectivamente. Portanto, a enzima aliinase é inibida pelas condições de acidez do estômago (LAWSON & HUGHES, 1992).

Produtos de alho que não contém alicina (FREEMAN & KODERA, 1995), após ingestão, não podem produzir alicina a partir da aliina porque a enzima aliinase é destruída pela acidez do estômago. Estudos "in vitro" têm mostrado que quando a alicina é adicionada em sangue fresco é rapidamente transformada (meia vida menor que 1 min) para alil mecaptano (alil-SH), mas a tentativa de encontrar allil mecaptano no sangue, urina ou fezes depois do consumo de alho ou de allil mecaptano tem sido falho, indicando que é rapidamente metabolizado (LAWSON, 1998a).

LAWSON & WANG (2005) realizaram um estudo em humanos, na qual, mediu a área acima da curva de 48 h após o consumo de preparações padronizadas de alho em pó, alicina e compostos derivados da alicina, o equivalente a 7 g de alho fresco. Os autores observaram que alil tiosulfonato (principalmente alicina) são unicamente responsáveis pela quebra do alil metil sulfeto (AMS) e aumentam a quebra da acetona. Dialil trissulfeto, dissulfeto de dialila, ajoeno e S-alilmercaptocisteína mostraram o mesmo efeito quantitativo que a alicina. Consumo de AMS também apresentou o mesmo efeito da alicina, indicando que AMS é o principal metabólito da alicina e um metabólito ativo. Em resumo, alicina e compostos derivados da alicina são rapidamente metabolizados pelo AMS, um composto no qual estimula a produção de acetona e pode ser utilizado para medir a biodisponibilidade da alicina e, por isso, a habilidade de suplementos de alho representarem o alho cru.

Os princípios ativos no alho não têm sido completamente caracterizados. Assim, a biodisponibilidade dos compostos organossulfurados assume um importante papel na determinação de respostas biológicas para várias preparações de alho (AMAGASE *et al.*, 2001).

1.2.3.2 Efeitos benéficos à saúde

Alho e suas preparações têm sido amplamente reconhecidos como agentes de prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e outras doenças metabólicas como, aterosclerose, hiperlipidemia, trombose, hipertensão e diabetes, além de possuírem uma variedade de efeitos biológicos como atividade antimicrobiana, antiinflamatória e anticâncer, assim como capacidade de diminuir níveis de gordura e pressão ocular. Muitos desses efeitos podem estar relacionados às suas atividades antioxidantes (AGARWAL, 1996; YANISHLIEVA-MASLAROVA & HEINONEN, 2001; MIRON *et al.* 2002).

A seguir são apresentadas as principais propriedades do alho na prevenção de algumas doenças.

1.2.3.2.1 Propriedades contra doenças cardiovasculares

Durante anos, diferentes preparações de alho têm sido investigadas na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, tanto estudos “in vitro” como “in vivo” (ensaios clínicos). Desde 1900, aproximadamente 170 estudos clínicos têm sido executados sobre o efeito do alho em humanos no potencial hipocolesterolêmico (REUTER & SENDL, 1994; HAN *et al.*, 1995; ADLER & HOLUB, 1997; LAWSON, 1998b). Em média, esses ensaios têm relatado a redução do colesterol total para 10-12% (KLEIJEN *et al.*, 1989; WARSHAFSKY *et al.*, 1993; SILAGY & NEIL, 1994; AGARWALL, 1996; REUTER *et al.*, 1996).

Compostos como S-alicisteína (SAC), dissulfeto de dialila (DADS) ou alicina e seus derivados (ajoeno) têm mostrado ser potentes inibidores na síntese de colesterol (GEBHARDT *et al.*, 1994; GEBHARDT & BECK, 1996). Isto sugere que o mecanismo implícito para ação inibitória é relatado para a inibição da síntese de colesterol e na diminuição da atividade de muitas enzimas colesterogênica, incluindo 3-hidroxi-3-metilglutaril (HMG)-CoA redutase e acetil-CoA sintetase (FOCKE *et al.*, 1990; AUGUSTI *et al.*, 2005). Estudos “in vitro” têm mostrado que compostos solúveis em água, como o SAC presente em extrato de alho envelhecido são menos citotóxicos e mais eficientes na inibição da biossíntese de colesterol do que compostos de enxofre solúveis em óleo como o sulfeto de dialila (DAS) (YEH & LIU, 2001).

Segundo KOJURI *et al.* (2007) a ingestão de tabletes de alho em pó (igual a 400 mg de alho, 1 mg de alicina) duas vezes ao dia, durante 6 semanas em pacientes hiperlipidêmicos, reduziu os níveis de colesterol total, LDL-colesterol e triglicérides e aumentou HDL-colesterol.

A alicina é um dos mais efetivos compostos organossulfurados do alho fresco, no qual um estudo “in vitro” (FREEMAN & KODERA, 1995) mostrou sua rápida redução no sangue e a interação com o ferro da hemoglobina, oxidando na forma trivalente para produzir metamioglobina (TAPIERO *et al.*, 2004).

O estudo realizado por ELKAYAM *et al.* (2003) teve como objetivo verificar o efeito da alicina no ganho de peso de ratos hipertensos, podendo ser aplicável no ganho de peso em humanos, já que a obesidade tem uma relação bem estabelecida entre excesso de peso do corpo, hipertensão e diabetes Tipo 2. Os animais foram induzidos com frutose e alimentados diariamente com 8 mg/kg de alicina durante

2 semanas. O resultado mostrou que não houve ganho de peso durante o consumo com alicina e o grupo controle, alimentado somente com uma dieta enriquecida com frutose, continuou a ganhar peso.

RAHMAN & LOWE (2006) fizeram uma revisão crítica desde 1993 sobre os efeitos do alho em relação a doenças cardiovasculares. Dos 25 ensaios clínicos avaliados em que investigaram os efeitos hipolipidêmicos do alho, 14 estudos mostraram que o alho não tinha nenhum efeito na redução de colesterol. É interessante notar que desses estudos, cinco foram realizados em indivíduos com estado lipídico normal, oito foram adultos que apresentaram estado hipercolesterolêmico moderado e um estudo foi em adolescente com família hipercolesterolêmica, sendo que nove usaram alho em pó, quatro usaram extrato de alho envelhecido (EAE) e um utilizou óleo de alho destilado com vapor de água. Os onze estudos que mostraram os efeitos positivos na redução do colesterol foram executados em indivíduos hipercolesterolêmicos; cinco estudos utilizaram EAE e o restante utilizou alho em pó.

ALDER *et al.* (2003) publicaram uma revisão sistemática da eficácia do alho como agentes anti-hiperlipidêmico. Eles incluíram 10 estudos e encontraram que em 6 estudos o alho foi efetivo na redução dos níveis de colesterol sérico. A redução média no colesterol total foi de 9,9 %, LDL 11,4 % e triglicérides 9,9 %.

SILAGY & NEIL (1994) analisaram 16 ensaios com dados de 952 sujeitos em estudo de meta análise e verificaram que o alho na forma em pó e não em pó reduziram significativamente os níveis de gordura no plasma no período de 1-3 meses. Houve redução de 8% de colesterol sérico com alho em pó e 15 % na forma não em pó. Níveis de triglicérides no plasma também reduziram significativamente, enquanto HDL-colesterol (Lipoproteína de alta densidade) permaneceu inalterado. A dose diária para o alho em pó foi em média de 600-900 mg.

Os resultados variáveis e conflitantes entre estudos "in vitro" e "in vivo" sugerindo que o alho tem a habilidade de reduzir parâmetros associados com doenças cardiovasculares podem ser devido à duração mais curta do estudo, incluindo procedimentos inadequados de delineamento experimental; efeito tempo-dependente do alho ou nenhuma aderência em estudos de longa duração (TATTELMAN, 2005; RAHMAN & LOWE, 2006).

Seguem algumas condições clínicas que contribuem para o aumento de incidência de doenças cardiovasculares e o efeito do alho em reduzir tais parâmetros:

1.2.3.2.1.1 Infarto agudo do miocárdio - IAM

As cardiopatias isquêmicas, também denominadas coronariopatias, são as designações genéricas de um grupo de síndromes cardíacas intimamente relacionadas, que resultam de um desequilíbrio entre a necessidade cardíaca de sangue oxigenado e seu suprimento. Dependendo da velocidade de desenvolvimento da isquemia e sua intensidade final, as cardiopatias isquêmicas podem ser divididas em quatro síndromes: angina *pectoris*, infarto do miocárdio, cardiopatia isquêmica crônica e a morte cardíaca súbita (CHAN & EGELAND, 2004; LUCAS *et al.*, 2005; ROBERT, 2005).

O IAM é uma síndrome clínica resultante do fluxo arterial coronariano deficiente para uma área do miocárdio, ocasionando morte celular e necrose. É ocasionado por uma placa vulnerável (rica em lipídeos) que, ao se romper, promove ativação plaquetária e formação de um trombo que pode ocluir totalmente a artéria coronariana (IAM do tipo supra de ST) ou levar à suboclusão vascular (IAM não supra de ST), podendo ocasionar dor torácica ou morte súbita (KANAN & HORSTMANN, 2006).

O infarto do miocárdio é a principal causa de mortalidade e morbidade em todo o mundo, sendo o responsável pela maioria das mortes atribuídas às cardiopatias isquêmicas, tendo como principais fatores de risco o alcoolismo, tabagismo, a hipertensão, *diabetes mellitus* e a hipercolesterolemia, que também são os principais fatores da aterogênese (LORGERIL *et al.*, 2002; LUCAS *et al.*, 2005; MUKAMAL *et al.* 2005).

Os marcadores bioquímicos relacionados ao desenvolvimento do IAM, de um modo geral, estão associados diretamente aos achados bioquímicos de aumento dos níveis de enzimas cardíacas como a Creatino Fosfoquinase (CPK), a Lactato desidrogenase (LDH), a Troponina I e a Creatino Fosfoquinase de Banda Muscular (CPK-MB), além de outras enzimas como as transaminases: glutâmico-oxalacética (TGO), também conhecida como aspartato-aminotransferase (AST), e a transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) ou alanina-aminotransferase (ALT). Os

resultados das suas concentrações no soro são capazes de expressar o tempo de isquemia e a extensão da necrose tecidual (infarto) (BIRNBAUM *et al.*, 1997; GRUND *et al.*, 1999; VON ECKARDSTEIN *et al.*, 1999; ROBERT, 2005; SUN *et al.*, 2005; SMITH *et al.*, 2006; LICHTENSTEIN *et al.*, 2006).

A Creatino Fosfoquinase (CPK) é uma enzima citoplasmática e a sua isoenzima CK-MB tem predominância no miocárdio. Os níveis sanguíneos da CK-MB aumentam nas primeiras 6 horas de evolução do infarto agudo do miocárdio, alcançando o seu valor máximo cerca das 14-36 horas. Considera-se que, quanto mais elevados forem os valores da CK-MB, maior será o tamanho do infarto agudo do miocárdio (SOARES-COSTA, 2005).

O complexo troponina consiste em três subunidades que regulam o processo mediado pelo cálcio na contração do músculo estriado, a saber: troponina C que se liga com o cálcio, troponina I (TnI) que liga a troponina à actomiosina. As TnT e TnI existem tanto no músculo esquelético como no músculo cardíaco, mas são codificadas por genes diferentes e a sua seqüência de aminoácidos é também diferente (SOARES-COSTA, 2005).

O alho tem um significativo efeito antiarritmico em ambas arritmias, ventricular e supra ventricular. Alho em pó (1% adicionado em uma ração padrão por um período de 8 semanas) reduziu significativamente a isquemia de reperfusão induzida por fibrilação ventricular, isolado em coração de rato (RIETZ *et al.*, 1995). Um estudo mostrou que a administração oral crônica de alho homogeneizado (125, 250 e 500 mg/kg, uma vez, diariamente, por 30 dias) preveniu o estresse oxidativo e associou mudanças na ultra-estrutura, induzido pela injúria de reperfusão isquêmica do miocárdio (BANERJEE *et al.*, 2001). Outro estudo mostrou uma redução significativa da zona isquêmica em ratos alimentados com ração padrão, enriquecida com 1% de alho em pó por 10 semanas (ISENSEE *et al.*, 1993).

BREITHAUPT-GROGLER *et al.* (1997) mostraram em um estudo “in vivo”, que a ingestão regular de alho em pó (≥ 300 mg/dia) por um longo período (≥ 2 anos) protegeu as células endoteliais da injúria oxidativa, tendo um efeito protetor nas propriedades elásticas da aorta, relacionadas ao envelhecimento em seres humanos. Já KIESEWETTER *et al.* (1993) mostraram que a ingestão de 800 mg/dia de alho em pó foi efetivo em pacientes com a doença oclusiva arterial periferal – Estágio II, além de uma diminuição significativa no plasma.

Estudos experimentais e epidemiológicos têm confirmado que o alho tem significativos efeitos benéficos na prevenção de doenças isquêmicas do coração (TURNER, 1990; ISENSSE *et al.*, 1993). Alho reduz em muito os fatores de risco o qual representa um papel decisivo na gênese e progressão de doenças isquêmicas do coração, por exemplo, efeito hipolipidêmico, redução da pressão arterial sangüínea e inibição da agregação plaquetária (AGARWAL, 1996).

1.2.3.2.1.2 Propriedade antiesclerótica

A aterosclerose é uma doença de espessamento das artérias, na qual lesões de gorduras chamadas ateromas se desenvolvem na superfície interna das paredes das artérias. Com o tempo, se proliferam para os tecidos dos músculos liso e fibroso formando placas e obstruções que podem reduzir o fluxo sanguíneo e podem levar a oclusão completa dos vasos (HOLUB *et al.*, 2002).

Tem sido hipotetizado que o alho pode prevenir e exercer possível função na terapia da aterosclerose, prevenindo a formação de placas, aumentando a regressão de placas, ou ambas. Um estudo realizado em animal demonstrou que o tratamento com alicina reduziu a espessura das camadas de gordura (lesões ateroscleróticas) em camundongos (ABRAMOVITZ *et al.*, 1999).

BREITHAUPT-GROLER *et al.* (1997) demonstraram que 300 mg de alho em pó ingerido por mais de 2 anos protegeu as propriedades elásticas na aorta humana.

Em um ensaio realizado em humanos no qual receberam uma suplementação de alho em pó de 900 mg/dia por 4 anos, constatou-se uma redução no volume de placas ateroscleróticas de 5-18 % (KOSCIELNY *et al.*, 1998).

Os COS do alho possuem propriedades anti-ateroscleróticas pela redução dos níveis de colesterol sérico em humanos (LAU *et al.*, 1987; PHELPS & HARRIS, 1993), inibem a biossíntese de colesterol (YEH & YEH, 1994), contem a oxidação da LDL, reduzem fibrinogênio no plasma e aumentam a atividade fibrinolítica (BORDIA *et al.*, 1977; HARENBERG *et al.*, 1988).

Estudos para a progressão média de aterosclerose podem ser executados utilizando a espessura intima-média (EIM), medida do volume de placas, ou ambas. Estes diagnósticos produzem importante informação sobre a morfologia da parede dos vasos arteriais. Placas da artéria carotídea parecem estar relacionadas com aumento de risco para o infarto do miocárdio e placas encontradas na artéria femoral

estão associadas ao aumento de risco para doenças isquêmicas do coração (KOSCIENLNY et al., 1998; HOLUB *et al.*, 2002).

O maior metabólito do ácido araquidônico formado pelas plaquetas é o TXA₂, um potente vasoconstritor e estimulador de agregação. Em contraste, PGI₂, o maior metabólito do ácido araquidônico formado pelas células endotelial vascular é um potente vasodilatador e inibidor da agregação plaquetária. Este balanço entre esses eicosanóides é importante na regulação da homeostase e da agregação plaquetária. Embora, o mecanismo de ação dos COS não esteja claro foi sugerido que pode ser devido ao efeito mediado pelo grupo sulfidril (APITZ-CASTRO *et al.*, 1994; TAPIERO *et al.*, 2004).

1.2.3.2.2 Atividade antimicrobiana

A alicina é suspeita de ser o principal agente antibacteriano do alho, enquanto os tiosulfonatos (aproximadamente 75% de alicina) são responsáveis pelos efeitos antimicrobianos no alho. Foi encontrado que a alicina pura exibiu atividade antibacteriana contra bactérias gram-negativas e gram-positivas. A atividade antibiótica de 1 mg de alicina tem sido igualada à de 15 UI de penicilina (HOLUB *et al.*, 2002).

Estudos têm demonstrado um efeito inibitório do alho e extrato de alho envelhecido sobre *Helicobacter pylori*, uma bactéria que causa úlceras gástricas e também está implicada na etiologia do câncer do estômago (CELLINI *et al.*, 1996; SIRVAM *et al.*, 1997). O'GARA *et al.* (2000) observaram em um estudo "in vitro" um efeito dose-dependente anti *H. pylori* do óleo de alho, alho em pó, alicina e dialil disulfido.

BENKEBLIA (2004) avaliou a atividade antimicrobiana em extrato de óleo essencial de três tipos de cebola (verde, amarela e vermelha) e alho utilizando diferentes concentrações (50, 100, 200, 300 e 500 mL/L) contra duas bactérias (*Staphylococcus aureus* e *Salmonella Enteritidis*) e três fungos (*Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* e *Fusarium oxysporum*). O extrato de alho mostrou alta atividade inibitória em todas as concentrações testadas e o extrato de cebola foi menos inibitório nas concentrações de 50 e 100 mL/L. A bactéria *S. aureus* mostrou pouca atividade inibitória e *S. Enteritidis* foi fortemente inibitório para a cebola vermelha e o alho. Os fungos (*A. niger* e *P. cyclopium*) foram significativamente

inibitórios a baixas concentrações de alho e o fungo *F. oxysporum* apresentou baixa atividade inibitória.

Muitos estudos em animais e humanos têm demonstrado que o consumo oral de alho e compostos relacionados com alicina têm efeitos antimicrobianos sistemáticos no pulmão, rim, sangue, cérebro e fluido cerebrospinal (LAWSON, 1998a).

1.2.3.2.3 Propriedades anticancerígenas

Há muitos estudos epidemiológicos que documentam o potencial do alho como agente anti-carcinogênico. Estudos comparando populações regionais na China têm evidenciado que a incidência de câncer gástrico é significativamente menor em regiões onde o consumo de alho é alto (20 g/dia) quando comparado com regiões onde o consumo de alho é baixo (~ 1 g/dia) (HAIXIU *et al.*, 1989; YOU *et al.*, 1989).

WEISBERGER & PENSKY (1958) demonstraram em estudos “in vitro” e “in vivo” que tiosulfonatos de extrato de alho inibiram o crescimento de células malignas e preveniam o crescimento de 180 tumores.

Numerosas investigações, “in vivo” e “in vitro”, tem examinado os efeitos anti-tumor de vários constituintes de alho (LIU & MILNER, 1990; BRADY *et al.*, 1991; HAN *et al.*, 1995; MILNER, 1996; SCHAFFER *et al.*, 1996; HU & SINGH, 1997; PINTO *et al.*, 1997; RIGGS *et al.*, 1997; SAKAMOTO *et al.*, 1997; LAWSON, 1998c; COHEN *et al.*, 1999; LAMM & RIGGS, 2000). Os autores têm sugerido que os efeitos anti-proliferativos do alho foram devido à alicina e aos polissulfidos.

Muitos compostos estão envolvidos em possíveis efeitos anti-cancerígenos do alho. O alho contém o enxofre alil e outros compostos que diminuem ou previnem o crescimento de células com tumor (LEA & AYYALA, 1997; SIGOUNAS *et al.*, 1997). Muitos pesquisadores têm observado que compostos de enxofre alil, que ocorrem naturalmente no alho e na cebola, combatem células vulneráveis ao estresse que são criadas pelos produtos da divisão celular. As células cancerosas se dividem muito rapidamente, gerando mais estresse no corpo do que a maioria das células normais. Portanto, as células cancerosas são danificadas pela presença de compostos de enxofre alil (FUKUSHIMA *et al.*, 1997).

1.2.3.3 Legislação

No Brasil, a Instrução Normativa nº5, de 11 de dezembro de 2008, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Ministério da Saúde, considera aliina ou alicina na lista de registro simplificado de fitoterápicos, sendo sua nomenclatura botânica: *Allium sativum* L.; nome popular: alho; parte usada: bulbo; formas de uso: tintura, óleo e extrato seco; indicações/alterações terapêuticas: coadjuvante no tratamento da hiperlipidemia e hipertensão arterial leve; prevenção da arterosclerose; dose diária: 2,7-4,1 mg de alicina; via de administração: oral e restrição de uso: venda sem prescrição médica (BRASIL, 2008).

Na União Européia, todos os produtos com alegações profiláticas e terapêuticas são classificados como produtos medicinais. Esses produtos podem ser comercializados em alguns estados membros da União Européia (Áustria, Dinamarca, Polônia, Eslovênia, Espanha, Reino Unido, Suécia, França e Alemanha) quando uma autorização de comercialização tem sido emitida tanto pela autoridade competente do estado membro para que seja feito no próprio território (autorização nacional) ou quando a autorização da comunidade tem sido concedida (KROES, 2006).

O HEALTH CANADA (2009) publicou uma monografia referente ao alho, em que constam informações na forma de bulbos ou óleo destilado dos bulbos e citando como declaração dos seus efeitos: tradicionalmente utilizado como erva medicinal ajudando a aliviar os sintomas associados com infecções do trato respiratório superior e condição catarral; ajudando a reduzir elevados níveis de gordura no sangue em adultos com hiperlipidemia e a manter a saúde cardiovascular em adultos. A dose diária para adultos com relação ao bulbo de alho é de 0,5 a 12 g; para alicina é de 1 a 12 mg e para aliina é de 2 a 27 mg. Para alho em pó as dosagens citadas são de 0,8 g a 1 g por dia.

1.2.3.4 Efeitos Adversos

O alho tem sido utilizado seguramente como alimento e condimento popular, além de ser utilizado com propósitos medicinais (AMAGASE *et al.*, 2001). A ingestão de um a dois dentes de alho cru por dia é considerada segura em adultos. O efeito mais comum na ingestão de alho é o odor no corpo e na respiração. Consumo em

quantidades excessivas de alho cru, especialmente de estômago vazio, pode causar transtorno gastrintestinal, flatulência e mudanças na flora intestinal (KOCH 1996; ACKERMANN *et al.*, 2001). Também tem sido relatado dermatites alérgicas, queimaduras e bolhas de aplicação direta de alho cru (ACKERMANN *et al.*, 2001) e anemia (KATSUNUMA, 1932; KUZUTANI, 1934; NAKAGAWA *et al.*, 1980).

Baseado em numerosos ensaios clínicos em humanos, a ingestão de alho cru até 10 g/dia (1 a 2 dentes de alho), ou 4-6 g de alho em pó/dia, é considerada segura quando ingerido em uma refeição (KOCH, 1996).

1.3 OBJETIVOS

1.3.1 Geral

Determinar a influência do processamento e armazenamento nas propriedades físico-químicas e funcionais em diferentes cultivares de alho (estudo “*in vitro*”) e avaliar os efeitos fisiológicos dos compostos funcionais sobre o metabolismo lipídico e o infarto agudo do miocárdio (estudo “*in vivo*”)

1.3.2 Específicos

- Determinar a perda de massa e os teores de sólidos solúveis totais, ácidos orgânicos tituláveis, compostos fenólicos, alicina e atividade antioxidante de bulbos de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang;
- Determinar compostos fenólicos, alicina e atividade antioxidante de alhos processados (liofilizado) das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang;
- Determinar a perda de massa e os teores de sólidos solúveis totais, ácidos orgânicos, compostos fenólicos, alicina e atividade antioxidante de bulbos de alho fresco e processado (liofilizado) das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante o armazenamento a $22 \pm 1^\circ\text{C}$, por 60 dias e sem luz;
- Avaliar o metabolismo lipídico (níveis de colesterol sérico - colesterol total, VLDL-colesterol, HDL-colesterol e nível de triglicérides) em ratos alimentados com alho processado (liofilizado) das cultivares Peruano e Jinxiang;

- Avaliar a ocorrência do infarto agudo do miocárdio em ratos alimentados com alho processado (liofilizado) das cultivares Peruano e Jinxiang.

1.4 MATERIAIS E MÉTODOS (“IN VITRO”)

1.4.1 Materiais

1.4.1.1 Amostras de alho

Após a colheita do alho das cultivares Caçador e Peruano, os bulbos passaram por um processo de cura ao sol, para pré-secagem. Este processo mantém a qualidade do alho e possibilita o armazenamento em condições adequadas (OLIVEIRA *et al.*, 2004). Após esta etapa, iniciou-se o armazenamento e processamento dos mesmos.

Foram utilizados 10 kg de bulbos de alho de cada cultivar, Caçador e Peruano, obtidos dos campos experimentais de produção da Embrapa Hortaliças, tendo sido produzidos no período de março a agosto de 2008. As amostras da cultivar Jinxiang, importada da China, adquiridas na Central de Abastecimento do Distrito Federal S.A. (CEASA-DF), foram colhidos em junho de 2008 e comercializadas no mercado nacional em setembro de 2008. Os bulbos foram armazenados em câmara fria a temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$.

1.4.2 Métodos

1.4.2.1 Seleção, classificação e armazenamento dos bulbos de alho

Foram selecionados manualmente bulbos frescos e sadios de tamanhos semelhantes das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang.

As amostras (5 kg) de cada variedade foram armazenadas em câmara a temperatura de $22 \pm 1^\circ\text{C}$ até o momento de serem processadas.

1.4.2.2 Processamento do alho liofilizado

As amostras foram colocadas em água à temperatura ambiente e descascadas manualmente, utilizando uma faca de cozinha. Posteriormente, foram embaladas em saco plástico e congeladas a temperatura de $-70 \pm 1^\circ\text{C}$ por aproximadamente 8 horas, utilizando ultra-freezer (ULT1386-5-D40, REVCO). Posteriormente, foram retiradas do freezer ainda congeladas e fatiadas em um processador industrial (CL50, Robot Coupe) na espessura de 5 mm e imediatamente liofilizadas (LS3000, Terroni) por aproximadamente 3 dias. O produto foi moído em um moinho de facas (SL31, Solab), colocado em sacos de polietileno, fechado e mantido em um dessecador.

A liofilização ou secagem a frio envolve dois métodos de conservação, o congelamento e a desidratação. O produto deve estar congelado a uma temperatura baixa, geralmente abaixo de -20°C , e depois ser submetido a uma pressão negativa (vácuo), fazendo com que a água dos produtos seja retirada por sublimação, ou seja, passando diretamente do estado sólido para o estado gasoso.

1.4.2.3 Amostras para vida de prateleira

As amostras (5 kg) de cada variedade foram armazenadas a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ de U.R. por 60 dias, e as análises foram conduzidas nos tempos 0, 15, 30, 45 e 60 dias.

1.4.2.4 Caracterização Físico-Química

Nas amostras de alho fresco foram determinados os teores de umidade, sólidos solúveis totais ($^\circ\text{Brix}$), acidez titulável, atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ ácido linoléico, compostos fenólicos totais e conteúdo de alicina.

Nas amostras de alho liofilizado foram determinadas a atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ ácido linoléico, compostos fenólicos totais e conteúdo de alicina.

Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

1.4.2.4.1 Determinação do teor de umidade

As análises foram realizadas segundo INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL (1985). As amostras foram colocadas em estufa (Q-317B, da Quimis) a 105°C, até atingir peso constante.

1.4.2.4.2 Determinação de sólidos solúveis (°Brix)

A presença de sólidos solúveis na água resulta em alterações do índice de refração. A determinação de sólidos solúveis (°Brix) foi realizada utilizando-se um refratômetro Digital (PR-1) da Atago, à temperatura de 25°C, segundo INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL (1985).

1.4.2.4.3 Determinação de acidez titulável

A determinação de acidez titulável foi realizada por titulometria segundo a metodologia descrita por MORETTI *et al.* (1998). Foram homogeneizados 20 g de tecido fresco em um Polytron (MA 102, da Marconi). Do homogenato centrifugado (17.600 g por 15 min) foram tomados 10 g do sobrenadante do tecido centrifugado e foram adicionados 50 mL de água deionizada. Foi realizada titulação com NaOH (0,1 mol/L) até o pH 8,2, onde considera-se que todos ácidos orgânicos predominantes tenham sido titulados. A acidez da solução foi expressa em miliequivalentes (meq) de ácido pirúvico por kg de tecido fresco.

As seguintes equações (1 e 2) foram utilizadas para os cálculos:

$$\text{Equação 1: } \% \text{ácido pirúvico} = [mL(NaOH) \times N(NaOH) \times 0,068 / 6] \times 100$$

$$\text{Equação 2: } meq \text{ácido pirúvico} = \% \text{ácido pirúvico} \times 10 / 0,068$$

1.4.2.4.4 Determinação de pH

As análises foram realizadas por meio do método potenciométrico (leitura direta em potenciômetro), segundo IAL (1985).

1.4.2.4.5 Obtenção do extrato etanólico de alho

O extrato etanólico de alho foi obtido para determinação das análises da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico e compostos fenólicos totais. Dentes de alho (3 g) foram descascados, esmagados utilizando um espremedor de alho caseiro e colocados em tubos plásticos de 100 mL, envolvidos por papel alumínio. A amostra foi então deixada em repouso por aproximadamente 6 minutos para que os COS fossem produzidos. Foram adicionados 20 mL de etanol 70% e os tubos fechados com filme plástico (Parafilm, EUA) e colocados sob agitação em um agitador orbital (EFOU-KT, da Hitachi) a 20,944 rad/s por 60 min. Após este período, os tubos foram colocados em um banho ultrassônico (1440 Plus, da Odontobrás), por 20 min. O extrato foi separado do resíduo pela filtração através de papel de filtro quantitativo (9 cm de diâmetro e 25 μ m de porosidade). O resíduo foi novamente submetido ao processo de extração, acima descrito. Os dois filtrados foram combinados em um balão volumétrico e o volume aferido para 50 mL.

Para amostra de alho liofilizado foi utilizado o mesmo procedimento, porém a massa da amostra foi de 0,3 g.

A Figura 3 ilustra o fluxograma do processo de obtenção do extrato etanólico de alho.

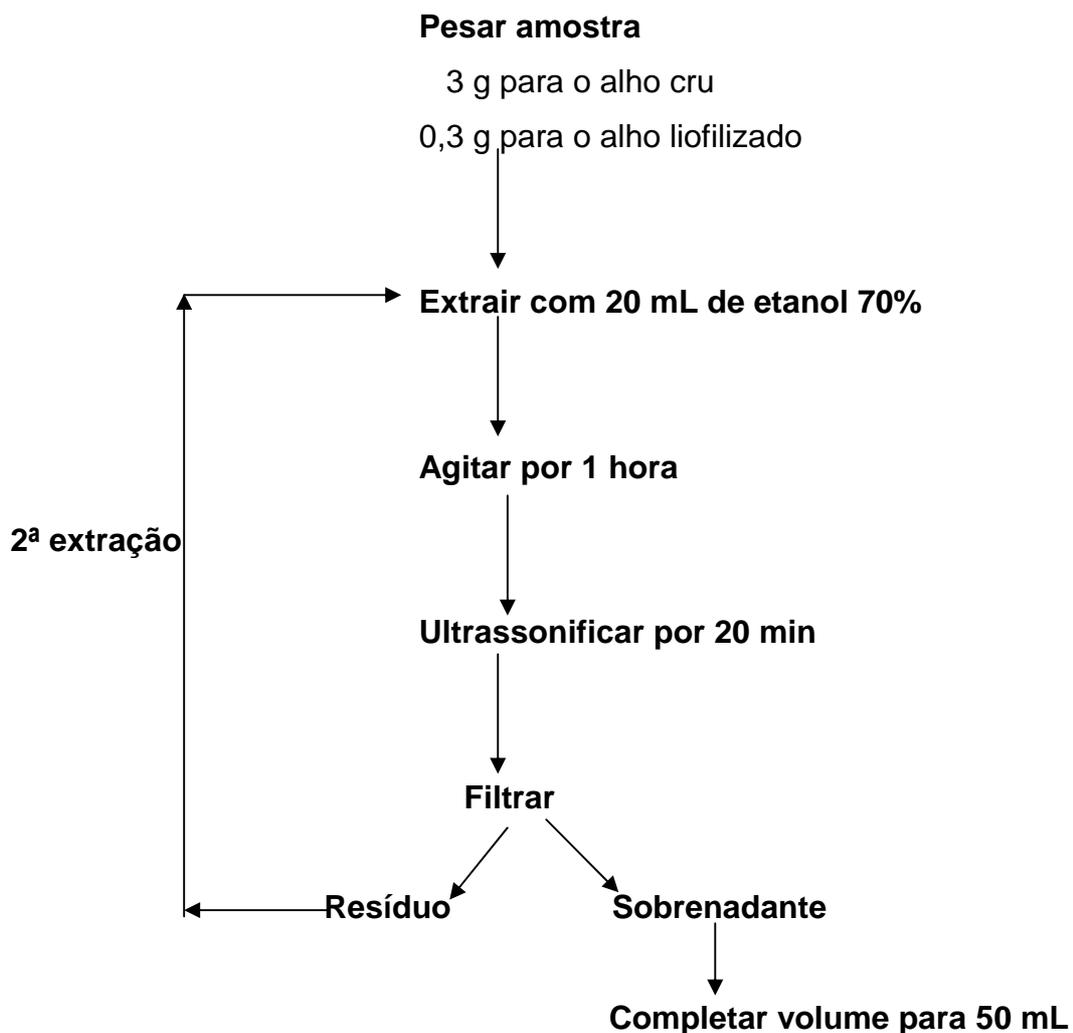


Figura 3 – Fluxograma do processo de obtenção do extrato etanólico de alho.

1.4.2.4.6 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ ácido linoléico

A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pela oxidação acoplada do β -caroteno e ácido linoléico segundo a metodologia descrita por AMIM & TAN (2002) e modificações de ISMAIL *et al.* (2004). Este método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoléico, ou seja, determina a atividade de uma amostra ou composto de proteger um substrato lipídico da oxidação. O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoléico. (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006).

Pipetou-se 1 mL da solução de β -caroteno (0,2 mg/mL clorofórmio) em um balão de fundo redondo contendo, 0,02 mL de ácido linoléico e 0,2 mL de 100% Tween 20. Após remoção do clorofórmio, em evaporador rotatório (TE-20, da Tecnal) a 40°C, a mistura foi imediatamente diluída em 100 mL de água destilada, sendo adicionada e agitada lentamente, para formar uma emulsão. Alíquotas (5 mL) desta emulsão foram transferidas para uma série de tubos de ensaio contendo 0,2 mL do extrato etanólico de alho (amostra); 0,2 mL de etanol 70% (controle) e 0,2 mL do BHT (butil hidroxitolueno) na concentração de 5 mg/50 mL de metanol (amostra utilizada como termo de comparação). O branco da mesma concentração da amostra foi utilizado para comparação, consistindo de 5 mL da emulsão sem β -caroteno. Após ser homogeneizado, a leitura foi feita em espectrofotômetro (SP-220, da Biospectro) a 470 nm, sendo esta a leitura no tempo zero (tempo inicial). Em seguida, os tubos foram colocados em banho-maria (Q-215-2, da Quimis) a 45°C por 2 horas e a absorbância foi registrada a cada 15 min.

A atividade antioxidante (AA) foi medida em termos do descoramento do β -caroteno, utilizando a equação (3):

Equação (3) : $AA = (1 - Ac / Aam) \times 100$, sendo

Ac= Abs inicial – Abs final,

Aam = Abs inicial – Abs final,

Ac= Absorbância controle,

Aam= Absorbância da amostra,

Abs = Absorbância.

1.4.2.4.7 Determinação do resíduo seco do extrato

A quantificação do resíduo seco das amostras foi determinada pelo método gravimétrico, segundo AOAC (1995). A sua determinação teve como objetivo a padronização da concentração das diferentes amostras para avaliação dos compostos fenólicos totais.

O volume de 10 mL do extrato foi transferido para uma cápsula de porcelana, previamente tarada, sendo posteriormente colocada em banho-maria a temperatura de 100°C, para que todo solvente fosse evaporado. A amostra então, foi colocada

em estufa a 105°C, por 2 horas, seguida de resfriamento em dessecador e pesagem, sendo a operação repetida até massa constante, obtendo-se o resíduo seco em mg/mL do extrato.

1.4.2.4.8 Determinação dos Compostos Fenólicos Totais

A determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais das amostras de alho cru e alho liofilizado foi realizada de acordo com o método espectrofotométrico descrito por SINGLETON & ROSSI (1965), modificado por NUUTILA *et al.* (2003), utilizando o reagente 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 (QUEIROZ, 2006).

Foram adicionados em tubos de ensaio 400 µL do extrato etanólico de alho, 400 µL de etanol 70%, 400 µL de Folin-Ciocalteu e 2000 µL da solução de carbonato de sódio 20% (m/v). Os tubos foram homogeneizados, utilizando um agitador de tubos (MS1, da IKA®). Posteriormente, foram adicionados mais 800 µL da solução de carbonato de sódio 20% (m/v). As amostras então, foram centrifugadas (centrífuga RC6 Plus, da Sorvall®) por 3 min, a 1466,1 rad/s e temperatura de 23 ± 1°C. Posteriormente, as amostras foram mantidas à temperatura ambiente por 20 min. A leitura da absorbância foi realizada em espectrofotômetro (U-100, da Hitachi) no comprimento de onda de 735 nm. A curva padrão foi plotada utilizando ácido gálico em 6 concentrações diferentes (0,005 a 0,03 mg/mL) (Equação 4).

Equação 4:

$$y = 29,339x + 1,2622 \quad R^2 = 0,9936$$

sendo:

y= teor de fenólicos totais

x= valor da absorbância

R² = coeficiente de determinação do modelo

Os resultados obtidos foram expressos em μg de ácido gálico por mL do extrato ou por mg em relação ao resíduo seco.

1.4.2.4.9 Determinação do teor de alicina

O teor de alicina foi determinado em cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de acordo com o método 110.001 do *Institute for Nutraceutical Advancement* (INSTITUTE FOR NUTRACEUTICAL ADVANCEMENT, 2005).

O extrato aquoso do alho liofilizado foi obtido pesando-se 0,4 g da amostra em tubos plásticos de 50 mL e adicionados de 10 mL de água deionizada a temperatura ambiente utilizando uma pipeta volumétrica. Em seguida, os tubos foram fechados, utilizando um pedaço de filme plástico (Parafilm), colocados sob agitação por 30 segundos, utilizando um agitador de tubos (MS1, da IKA[®]) para evitar a formação de grumos e deixado em repouso por aproximadamente 6 min para que os COS fossem produzidos. Posteriormente, cada amostra foi filtrada através de uma membrana filtrante de nylon de 0,45 μm (Millipore) e transferida para um frasco de CLAE.

Para o extrato aquoso do alho fresco, dentes de alho (0,7 g a 0,9 g) foram descascados, sem injuriar a amostra, esmagados, utilizando um espremedor de alho caseiro, colocados em tubos plásticos de 50 mL e deixado em repouso por aproximadamente 6 min para que os COS fossem produzidos. Em seguida, foram adicionados 10 mL de água deionizada à temperatura ambiente utilizando uma pipeta volumétrica e os tubos fechados, utilizando-se um pedaço de filme plástico (Parafilm) e colocados sob agitação por aproximadamente 30 segundos, com a ajuda de um agitador de tubos. Posteriormente, cada amostra foi filtrada através de uma membrana filtrante de nylon de 0,45 μm (Millipore) e transferidas para um frasco de CLAE.

As análises foram conduzidas em cromatógrafo a líquido de alta eficiência com coluna de fase reversa LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 μm) da Shimadzu, equipado com uma bomba de gradiente 300 psi LC, com módulo degasificante (DGU-M10A), válvula micro-injetora, detector UV de arranjo de iodo (SPD-M10A) com comprimento de onda de 240 nm, injetor manual e automático de amostras (SIL-10AF) e forno (CTO-10A) com temperatura de $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$, da marca Shimadzu,

eluído com metanol e água, na proporção 50:50, a um fluxo de 1,0 mL/min e volume de injeção de 25 µl. Tempo de análise de 15 min.

Todas as análises foram realizadas em triplicata.

1.4.2.4.9.1 – Preparo e determinação da síntese de alicina (a ser utilizada como padrão cromatográfico)

O padrão de alicina foi determinado por cromatografia líquida de alta eficiência, segundo LAWSON & WANG (2001). A alicina foi preparada com alto grau de pureza (98%) pela oxidação do dissulfeto de dialila.

Inicialmente, 1 g de dissulfeto de dialila foi dissolvido à frio (4°C) em 5 mL de ácido acético glacial, sendo adicionado suavemente 1,5 mL de peróxido de hidrogênio (30%). Após 30 min, a temperatura foi aumentada para $13 \pm 1^\circ\text{C}$ e a reação foi mantida por 6 horas em agitação constante, até que o conteúdo de dissulfeto de dialila diminuiu para aproximadamente 75-80%. A reação foi interrompida com adição de 15 mL de água, seguida de extração com 30 mL de diclorometano. O ácido acético glacial foi removido pela lavagem do extrato por três vezes consecutivas com bicarbonato de sódio a 5% e então lavado com água deionizada até que o pH atingisse valores entre 6 a 7. Posteriormente, o solvente foi evaporado, utilizando um evaporador rotatório (TE20, Tecnal). A alicina foi redissolvida em 500 mL de água deionizada e o dissulfeto de dialila remanescente e outras possíveis impurezas de baixa polaridade foram removidos por duas extrações com hexano. A quantidade de hexano utilizada correspondeu a 10% do total do subproduto da solução. A solução de alicina foi mantida a 4°C por 2 meses.

As análises foram conduzidas em CLAE com coluna de fase reversa LC-18 (150 x 4,6 mm, 5 µm) da Shimadzu, com temperatura de $28 \pm 0,5^\circ\text{C}$, eluído com metanol e água, na proporção 50:50, a um fluxo de 1,0 mL/min e tempo de análise de 30 min. Para a curva de calibração, foram feitas leituras, em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 240 nm e 254 nm e calculada a razão de absorvância (240nm/254nm). O cálculo da concentração de alicina (C) na solução foi realizado de acordo com a seguinte equação:

Equação 5:

$$E = \frac{\text{Absorbância} \times (10000)}{1\text{cm} \times C(\mu\text{g/mL})} \quad \text{sendo:}$$

E = coeficiente de extinção para alicina em água de 145,4 (1 cm célula e leitura a 240 nm).

Posteriormente, diluições foram feitas para as concentrações de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 $\mu\text{g/mL}$ e analisadas por CLAE, para a construção da curva padrão (Equação 6).

Equação 6:

$$y = 87338x - 46478 \quad R^2 = 0,9981$$

sendo:

y = valor da área total

x = teor de alicina

R^2 = coeficiente de determinação do modelo

Os resultados obtidos foram expressos em microgramas (μg) por 25 mL do extrato aquoso.

1.4.2.4.10 Delineamento Experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado em esquema fatorial, da seguinte forma:

Alho fresco: (3 cultivares x 5 tempos de armazenamento = 15 tratamentos), com 3 repetições ($n=100$ g ou 10 bulbos de alho);

Alho liofilizado: (3 cultivares = 3 tratamentos), com 3 repetições ($n=100$ g ou 10 bulbos de alho);

1.4.2.4.11 Análise Estatística

Os resultados obtidos foram analisados utilizando a análise de variância (ANOVA) e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

1.5 MATERIAIS E MÉTODOS (“IN VIVO”)

1.5.1 Materiais

1.5.1.1 Amostras para pesquisa animal

Foram utilizados ratos machos ($n=60$), Wistar, provenientes da Bioagri Laboratórios/ Planaltina-D.F. Os animais tinham aproximadamente 2 meses de idade para o início do estudo, pesando entre 160 a 200 g, que foram mantidos no Biotério Setorial da Faculdade de Ciências da Saúde (FS) / Faculdade de Medicina (FM), da Universidade de Brasília. Durante os 15 dias do experimento, os animais foram acondicionados individualmente em gaiolas de polipropileno, em sala isolada, com temperatura $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade $60 \pm 1\%$ e fotoperíodo de 12 horas (Figura 4).

As amostras de alho em pó liofilizado utilizadas no experimento animal foram das cultivares Peruano e Jinxiang. A cultivar Peruano apresentou melhores resultados nas propriedades funcionais em relação a cultivar Caçador no estudo “in vitro”.



Figura 4 – Acondicionamento dos animais experimentais.

1.5.1.2 Tratamentos

O estudo foi realizado em duas etapas: a) uma sem esforço físico (para avaliar o efeito do alho no metabolismo lipídico) e b) outra com esforço físico (para avaliar o efeito do alho no infarto agudo do miocárdio). Os tratamentos tiveram duração de 15 dias, sendo que os animais foram tratados com colesterol e colato de sódio para induzir o estado hiperlipidêmico. Os animais receberam dieta adicionada de alho durante 15 dias, em ambas as etapas e no 16º dia os animais da etapa (b) foram submetidos ao esforço físico por meio do nado forçado, no qual os animais passaram por um processo de exaustão, gerando assim um desequilíbrio entre a necessidade cardíaca de sangue oxigenado e seu suprimento, desenvolvendo uma isquemia. Os tratamentos foram conduzidos no Biotério Setorial e no Centro de Cirurgia Experimental (CIEX) da Faculdade de Ciências da Saúde (FS) / Faculdade de Medicina (FM), da Universidade de Brasília.

1.5.1.3 Grupos de estudo

1.5.1.3.1 Experimento sem esforço físico

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em 6 grupos de 5 animais (Tabelas 4 e 5). Os **Grupos 1** (Controle), **3** (Controle – Alho Liofilizado Peruano - CAP) e **4** (Controle – Alho Liofilizado Jinxiang – CACH) receberam somente uma dieta basal purificada. Os **Grupos 2** (Hiperlipidemia – Controle – HPLC), **5** (Hiperlipidemia – Alho Liofilizado Peruano – HPLP) e **6** (Hiperlipidemia – Alho Liofilizado Jinxiang - HPLCH) receberam uma dieta purificada (preparada em formato de pellet, para ser consumida voluntariamente *ad libitum*), contendo 0,5 % de colesterol e 0,125 % de colato de sódio para induzir o estado hiperlipidêmico, conforme o modelo de YANAGITA *et al.* (2003). As dietas foram oferecidas aos animais durante 15 dias. Nesse mesmo período os Grupos 3, 4, 5 e 6 receberam, diariamente, uma dieta complementar de alho (equivalente a 500 mg de alho liofilizado/kg massa do animal), por gavagem, conforme estudos realizados por ALLI *et al.* (2000). No 16º dia os animais passaram por uma avaliação bioquímica, para avaliar a influência do alho no metabolismo lipídico.

Tabela 4 – Grupos de estudo a serem avaliados após indução da hiperlipidemia, com e sem a influência do alho

Grupo de estudo	Processamento
1 Controle	–
2 Hiperlipidemia-Controle (HPLC)	–
3 Controle – Alho Peruano – CAP	Alho liofilizado
4 Controle – Alho Jinxiang - CACH	Alho liofilizado
5 Hiperlipidemia – Alho Peruano – HPLP	Alho liofilizado
6 Hiperlipidemia – Alho Jinxiang - HPLCH	Alho liofilizado

Tabela 5 – Número de animais a serem utilizados por grupo de estudo, após indução da hiperlipidemia, com e sem a influência do alho

Grupo de estudo	Número de animais
1 Controle	5
2 Hiperlipidemia – Controle – HPLC	5
3 Controle – Alho Peruano – CAP	5
4 Controle – Alho Jinxiang – CACH	5
5 Hiperlipidemia – Alho Peruano – HLPP	5
6 Hiperlipidemia – Alho Jinxiang – HPLCH	5
Total	30

1.5.1.3.2 Experimento com esforço físico

Os animais foram distribuídos, aleatoriamente, em 6 grupos de 5 animais (Tabelas 6 e 7). Os **Grupos 1** (Controle), **3** (Controle – Alho Liofilizado Peruano - CAP) e **4** (Controle – Alho Liofilizado Jinxiang – CACH) receberam somente uma dieta basal purificada. Os **Grupos 2** (Hiperlipidemia – Controle – HPLC), **5** (Hiperlipidemia – Alho Liofilizado Peruano – HPLP) e **6** (Hiperlipidemia – Alho Liofilizado Jinxiang - HPLCH) receberam uma dieta purificada (preparada em formato de pellet, para ser consumida voluntariamente *ad libitum*), contendo 0,5 % de colesterol e 0,125 % de colato de sódio para induzir o estado hiperlipidêmico, conforme o modelo de YANAGITA *et al.* (2003). As dietas foram oferecidas aos animais durante 15 dias. Nesse mesmo período os Grupos 3, 4, 5 e 6 receberam, diariamente, uma dieta complementar de alho (equivalente a 500 mg de alho liofilizado/kg massa do animal), por gavagem, conforme estudos realizados por ALL *et al.* (2000). No 16º dia os animais passaram por uma avaliação comportamental e bioquímica, para avaliar a influência do perfil hiperlipidêmico e a influência do alho no infarto agudo do miocárdio.

Tabela 6 – Grupos de estudo a serem avaliados no infarto agudo do miocárdio, após indução da hiperlipidemia, com e sem influência do alho

Grupo de estudo	Processamento
1 Controle	–
2 Hiperlipidemia – Controle – HPLC	–
3 Controle – Alho Peruano – CAP	Alho liofilizado
4 Controle – Alho Jinxiang - CACH	Alho liofilizado
5 Hiperlipidemia – Alho Peruano – HPLP	Alho liofilizado
6 Hiperlipidemia – Alho Jinxiang - HPLCH	Alho liofilizado

Tabela 7 – Número de animais a serem utilizados por grupo de estudo na avaliação do infarto agudo do miocárdio, após indução da hiperlipidemia, com e sem a influência do alho

Grupo de estudo	Número de animais
1 Controle	5
2 Hiperlipidemia – Controle – HPLC	5
3 Controle – Alho Peruano – CAP	5
4 Controle – Alho Jinxiang – CACH	5
5 Hiperlipidemia – Alho Peruano – HLPP	5
6 Hiperlipidemia – Alho Jinxiang – HPLCH	5
Total	30

1.5.2 Métodos

1.5.2.1 Dietas

Quatro dietas foram elaboradas, em conformidade com as recomendações do *American Institute of Nutrition* para roedores em crescimento (AIN 93G) (REEVES *et al.*, 1993).

- Controle: dieta controle normolipídica;
- CAP: dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano;

- CACH: dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang;
- HPLC: dieta controle hiperlipídica;
- HPLP: dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano;
- HPLCH: dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang.

O alho liofilizado não foi adicionado diretamente à dieta, mas acrescida para realização do cálculo final da dieta.

A Tabela 8 lista os ingredientes e quantidade para cada dieta.

Tabela 8 – Composição das dietas experimentais.

Ingredientes (g/kg)	Controle	CAP/CACH	HPLC	HPLP/HPLCH
Amido de milho [†]	529,49	524,49	523,24	518,24
Caseína (≥ 85% de proteína) [†]	200	200	200	200
Sacarose [‡]	100	100	100	100
L-cistina [†]	3	3	3	3
Óleo de soja [§]	70	70	70	70
Celulose microcristalina [†]	50	50	50	50
Mistura mineral – AIN93G [†]	35	35	35	35
Mistura vitamínica – AIN93G [†]	10	10	10	10
Bitartarato de colina [†]	2,5	2,5	2,5	2,5
Tert-butilhidroquinona [£]	0,014	0,014	0,014	0,014
Colesterol [£]	–	–	5	5
Colato de sódio [£]	–	–	1,25	1,25
Alho Liofilizado	–	5	–	5
Total	1000	1000	1000	1000

[†] Rhoster Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande Paulista, SP, Brasil).

[‡] Vetec Química Fina (SP, Brasil).

[§] Refinações de Milho Brasil

[£] Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA).

1.5.2.2 Preparo das amostras de alho

O extrato aquoso de alho liofilizado foi preparado diariamente antes da dieta. A quantidade foi equivalente a 500 mg de alho liofilizado/kg massa do animal (GORISTEIN *et al.*, 2006), que foi dada aos animais por gavagem (Figura 5). Cada animal dos grupos (CAP, CACH, HPLP e HPLCH) recebeu 1 mL do extrato de alho. Durante o experimento a dose utilizada de alho foi ajustada de acordo com o aumento de massa dos animais experimentais.



Figura 5 – Animal alimentado por gavagem.

1.5.2.3 Procedimento Experimental

1.5.2.3.1 Experimento sem esforço físico

Antes de iniciar os tratamentos, os animais permaneceram em período de adaptação ao ambiente por 5 dias, recebendo dieta comercial (Labina, Purina, Brasil). Após este período, os animais dos diferentes grupos receberam suas respectivas dietas e água *ad libitum*, durante os 15 dias do estudo. O controle do consumo de dieta foi efetuado diariamente e o controle de peso foi realizado a cada dois dias ao longo do tratamento. No 16° dia, os animais foram pesados,

anestesiados pela via intraperitoneal com uma associação de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg) (Figura 6). Em seguida, realizou-se a fixação dos animais na bancada e retirada do sangue por pulsão cardíaca (Figura 7). A eutanásia dos animais foi realizada com superdose de barbitúrico. O sangue coletado foi, imediatamente, transferido para tubos de hemólise secos com tampa, estocados em reservatório contendo gelo e encaminhados ao Centro de Patologia Clínica, do Hospital Universitário de Brasília (HUB) para as realizações dos exames laboratoriais, onde foram analisadas as concentrações plasmáticas de Triglicerídeos, Colesterol total e HDL-Colesterol (Lipoproteínas de alta densidade), VLDL-colesterol (Lipoproteínas de densidade muito baixa) e glicose. Os parâmetros bioquímicos: creatinoquinase (CK), creatinoquinase fração MB (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH), transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP) foram analisadas para serem utilizadas como comparativo no experimento com esforço físico.

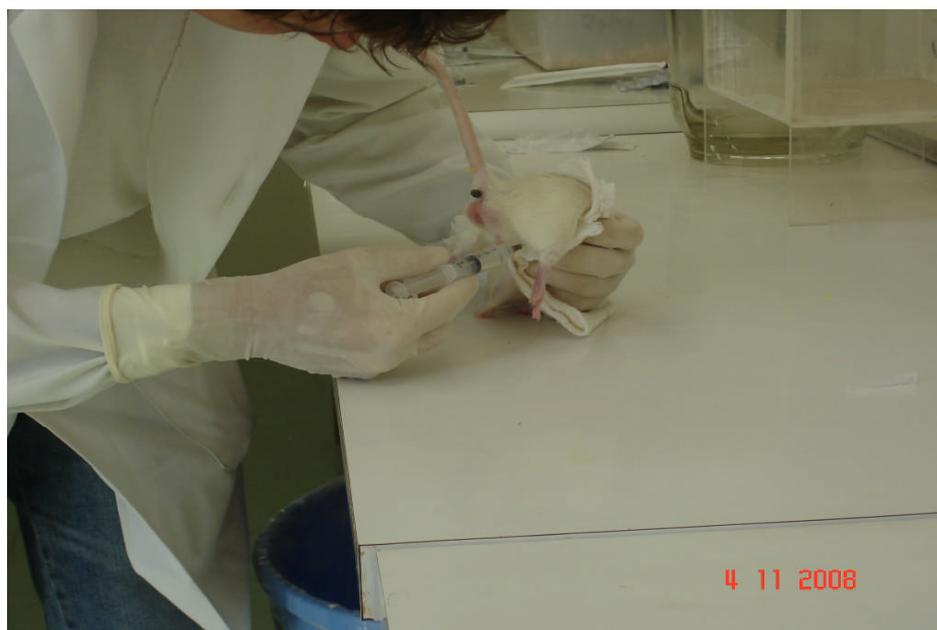


Figura 6 – Animal anestesiado pela via intraperitoneal.

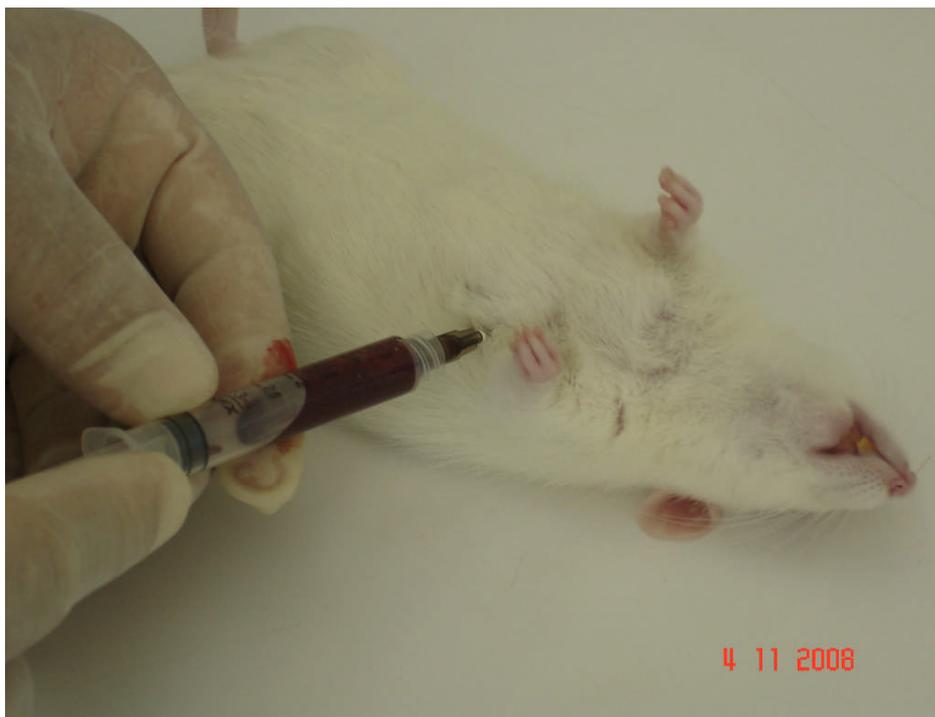


Figura 7 – Retirada de sangue por pulsão cardíaca.

1.5.2.3.2 Experimento com esforço físico

Antes de iniciar os tratamentos, os animais permaneceram em período de adaptação ao ambiente por 5 dias, recebendo dieta comercial (Labina, Purina, Brasil). Após este período, os animais dos diferentes grupos receberam suas respectivas dietas e água *ad libitum*, durante os 15 dias do estudo. O controle do consumo de dieta foi efetuado diariamente e o controle de peso foi realizado a cada dois dias ao longo do tratamento. No final do experimento, os animais foram submetidos a um jejum alimentar de 12 horas, com água *ad libitum*. Após este período, no 16º dia, iniciou-se o teste do nado forçado até a exaustão, segundo os métodos de PEIXOTO (2007) e HATA *et al.* (1995), com modificações. A piscina redonda tinha 50 cm de diâmetro por 80 cm de altura e uma lâmina de água contendo 70 cm. Foi utilizado um balde branco nessas dimensões simulando uma piscina redonda, contendo água em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Os animais permaneceram na água durante 50 minutos, sendo submetidos a esta atividade sempre em duplas (um animal experimental mais um controle) (PEIXOTO, 2007).

Dado o início do experimento foram observados dois tipos de comportamento nesses animais, um caracterizado por *fuga* (Figura 8) aproximadamente nos dois primeiros minutos, e outro caracterizado por imobilidade (Figura 9), na tentativa de

flutuar com os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da água. Para evitar o afogamento após exaustão, este teste foi acompanhado por um examinador fazendo-se uso de um equipamento de resgate dos animais, que consistiu de uma peneira larga. Todas as vezes que os mesmos apresentaram algum sinal de afogamento, eles foram trazidos à superfície da água. O critério utilizado para a constatação de um possível afogamento foi à permanência do animal submerso, por mais de 10 segundos, sem apresentar a intenção de voltar à superfície da água. Após os 50 minutos regulamentares, os animais foram retirados da água e anestesiados pela via intraperitoneal com uma associação de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). Em seguida, realizou-se a fixação dos animais na bancada e procedeu-se a retirada do sangue por pulsão cardíaca. A eutanásia dos animais foi realizada com superdose de barbitúrico. O sangue coletado foi, imediatamente, transferido para tubos de hemólise secos com tampa, estocados em reservatório contendo gelo e encaminhados ao Centro de Patologia Clínica, do Hospital Universitário de Brasília (HUB) para as realizações dos exames laboratoriais, onde foram analisadas as concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total, HDL-Colesterol, VLDL-Colesterol, glicose, creatinoquinase (CK), creatinoquinase fração MB (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH), transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP).



Figura 8 – Comportamento do animal caracterizado por *fuga*, no teste de nado forçado.



Figura 9 – Comportamento do animal caracterizado por imobilidade, no teste de nado forçado.

1.5.2.4 Dosagens Bioquímicas

O sangue, armazenado em tubos de hemólise secos com tampa e estocados em reservatório contendo gelo, foi levado para processamento bioquímico em no máximo 1 hora após a coleta. O plasma foi separado por centrifugação (SIGMA, 2-5) a 366,5 rad/s, por 10 min, em temperatura ambiente e foi feito processamento imediato das amostras. Os ensaios bioquímicos, por meio de sistemas enzimáticos específicos, foram realizados conforme critérios pré-estabelecidos pelo fabricante de cada “kit” para as seguintes dosagens: Triglicerídeos (ABBOTT); Colesterol total (ABBOTT); HDL-colesterol direto, sem precipitação (ABBOTT); glicose (ABBOTT); CK (ABBOTT); CK-MB (ABBOTT); LDH (ABBOTT); TGO (ABBOTT) e TGP (ABBOTT). A leitura dos teores de cada um dos componentes anteriormente descritos foi realizada em um espectrofotômetro (equipamento automatizado ARCHITECH C8000) do Centro de Patologia Clínica, do Hospital Universitário de Brasília (HUB). A fração de VLDL-colesterol foi calculada (Equação 7), de acordo com FRIEDEWALD *et al.* (1972).

Equação 7: $VLDL - \text{colesterol} = (\text{Triglicerídeos} / 5)$, utilizadas para valores de triglicerídeos menores que 400 mg/dL.

1.5.2.5 Delineamento estatístico

Tanto para o experimento SEF e CEF: o delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos, com 5 repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e todas as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os valores de cada resultado foram expressos pela média \pm desvio padrão.

1.5.2.6 Considerações Éticas

O projeto intitulado “Propriedade Funcionais “In Vitro” e “In Vivo” de Alhos Frescos e Processados” foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, UNBDOC nº 18914/2008 (Anexo 1) e pela Diretoria Adjunta de Ensino e Pesquisa (DAEP) do Hospital Universitário de Brasília (HUB) para realização das análises bioquímicas.

2. PARTE II – EXPERIMENTOS “IN VITRO”

2.1 CAPÍTULO 1

Síntese de Alicina por oxidação acompanhada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE)

Resumo

Alicina (dialil tiosulfonato) é o mais importante composto bioativo no alho. Acredita-se que esta substância está relacionada com a prevenção de muitas doenças crônicas, tais como aterosclerose e infarto do miocárdio. O principal objetivo do presente trabalho foi caracterizar as etapas mais importantes da síntese de alicina do processo oxidativo do dissulfeto de dialila com peróxido de hidrogênio visando a utilização da alicina como um padrão cromatográfico e podendo essa análise ser empregada como controle de qualidade para a comercialização do alho no mercado nacional. Um grama de dissulfeto de dialila foi dissolvido em ácido acético e misturado com água oxigenada. A reação foi mantida a $13 \pm 1^\circ\text{C}$ por 6 horas sob agitação constante. A reação foi interrompida e a extração foi realizada com diclorometano. O ácido acético foi removido e o solvente foi evaporado. Alicina foi então dissolvida em água deionizada e os residuais de dissulfeto de dialila e outras possíveis interferências de baixa polaridade foram removidas por extração com hexano. Pureza (% m/m) foi determinada por cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando o coeficiente de extinção para ajoeno, a maior impureza. O produto final obtido foi considerado eficiente, apresentando uma conversão de 88% do dissulfeto de dialila para alicina.

Palavras-chave: alicina, alho, tiosulfonatos, síntese.

Oxidative allicin synthesis tracked by high performance liquid chromatography (HPLC)

Abstract

Allicin (diallyl thiosulfinate) is the most important bioactive compound in garlic. It is believed that this substance is related to the prevention of many chronic diseases such as atherosclerosis and myocardial infarction. The main objective of the present work was to characterize the most important steps of allicin synthesis from the oxidative process of diallyl disulfide with hydrogen peroxide aiming at the utilization of allicin as a chromatographic standard that can be used as quality control for marketing garlic in the domestic market. One gram of diallyl disulfide was dissolved in acetic acid and mixed with hydrogen peroxide. The reaction was maintained at $13 \pm 1^\circ\text{C}$ for 6 hours under constant mixing. The reaction was stopped and the extraction was carried out with dichlorine methane. Acetic acid was removed and the solvent was evaporated. Allicin was then dissolved in deionized water and the remaining diallyl disulfide and other possible low polarity interferences were removed by extraction with hexane. Purity (%m/m) was determined by high performance liquid chromatography using the extinction coefficient for ajoene, the major impurity. The final product obtained was considered efficient, showing a 88% conversion of diallyl disulfide to allicin.

Keywords: allicin, garlic, thiosulfinates, synthesis.

2.1.1 Introdução

O alho (*Allium sativum* L.) tem sido utilizado em culinária como condimento e com propósitos medicinais desde a antiguidade. Numerosos efeitos benéficos têm sido associados com a ingestão regular de alho, como a redução do risco de câncer e doenças cardiovasculares. Esses efeitos positivos na ingestão de alho são atribuídos aos compostos organossulfurados (COS), que constituem uma importante classe de compostos biologicamente ativos, incluindo sulfóxidos e γ -glutamil peptídeos que estão presentes no alho cru (HOLUB *et al.*, 2002; ICHIKAWA, 2006).

O alho contém 33 COS, sendo que 1 g de alho fresco contém de 11 a 35 mg destes compostos. Essa quantidade foi observada ser quatro vezes maior em outros

vegetais, como a cebola, brócolis, couve-flor e damasco (HOLUB *et al.*, 2002). Entre os COS, a alicina é o principal tiosulfonato e considerado um dos compostos biologicamente mais importante produzidos pelo alho (LAWSON *et al.*, 1991).

Os COS de dentes de alho intactos são compostos de cisteína sulfóxido (principalmente aliina, seguido de menor quantidade da metiina e isoaliina) e γ -glutamilcisteínas (principalmente γ -glutamil-S-alilcisteína e γ -glutamil-S-metilcisteína) (HOLUB *et al.*, 2002). Quando o alho é mecanicamente rompido, a aliinase ou aliina liase (EC 4.4.1.4.) catalisa a conversão da cisteína sulfóxido para dialil tiosulfonato via ácidos sulfênicos intermediários (BLOCK, 1992). A aliinase é dependente da temperatura e do pH, sendo sua atividade ótima entre pH 5,0 – 10,0. Entretanto, a aliinase pode ser irreversivelmente desativada em pH 1,5 – 3,0 (KREST & KEUSGEN, 1999). A transformação da aliina para a alicina no alho fresco em presença da enzima aliinase, é rápida e completa, levando menos do que 10 segundos a 23°C (Figura 10) (MICHAEL *et al.*, 2004).

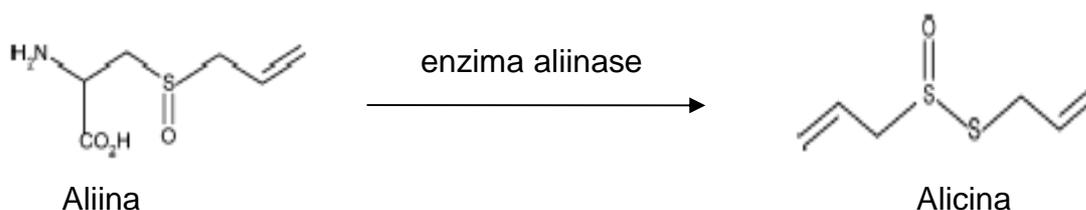


Figura 10 – Formação da alicina pela aliina em alho fresco (LAWSON & WANG, 2001).

Alicina pura é uma molécula volátil, sendo pouco solúvel em soluções aquosas. Tem o odor pungente, característico do alho. A estrutura química da alicina foi descoberta em 1947, quando foi demonstrado que poderia ser sintetizada pela oxidação do dissulfeto de dialila (KOCH & LAWSON, 1996).

A instabilidade da alicina é um grande problema, pois, o produto deve ser importado e seu transporte representa um obstáculo significativo para a sua utilização como padrão em muitos laboratórios em todo o mundo. Portanto, a maioria dos métodos publicados descreve a utilização da alicina sintetizada e purificada em laboratório onde a análise será efetuada (RYBAK *et al.*, 2004).

Tiosulfonatos, como alicina podem ser sintetizados pela oxidação do correspondente dissulfeto com perácidos ou peróxido de hidrogênio, por exemplo, dissulfeto de dialila (DADS) (Figura 11) (BLOCK *et al.*, 1993).

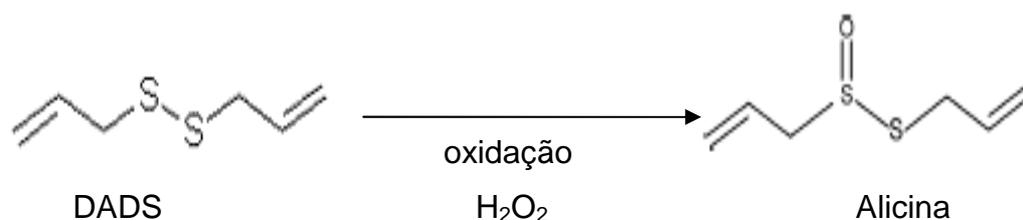


Figura 11 – Formação da alicina a partir do DADS (TAPIERO *et al.*, 2004).

Durante uma síntese orgânica, que em geral, são reações de longa duração, muitas vezes não se sabe se a reação está ocorrendo ou não, para tanto é necessário que alíquotas dos reagentes sejam retiradas e analisadas para certificar a ocorrência da transformação de todos os reagentes no produto desejado. Essas análises são, muitas vezes, demoradas. Na síntese da alicina pode-se utilizar de várias ferramentas para acompanhar a reação, mas a mais rápida e prática é a CLAE.

Com base nas informações fornecidas acima, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de estudar as várias etapas da síntese de alicina pelo dissulfeto de dialila, com o propósito de utilizá-la como um padrão para a avaliação do conteúdo de alicina em diferentes cultivares de alho cultivado e comercializado no Brasil.

2.1.2 Material e Métodos

2.1.2.1 Material

Todos os reagentes utilizados foram grau CLAE. Dissulfeto de dialila ($\text{C}_3\text{H}_5\text{SSC}_3\text{H}_5$), 80%, foi obtido da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, EUA). Ácido acético, peróxido de hidrogênio, bicarbonato de sódio, metanol, hexano, diclorometano e o papel indicador para pH (0-14) foram obtidos da Merck (Darmstadt, Alemanha). Os equipamentos utilizados foram o evaporador rotatório (TE – 20, Tecnal, Brasil), cromatógrafo líquido de alta eficiência (LC-10ADV, Shimadzu, Japão) acoplado a detector de arranjo de diodo (SPD-M10A, Shimadzu, Japão) e um espectrofotômetro (U-1100, Hitachi, Japão).

2.1.2.2 Metodologia para síntese de alicina

Este método foi descrito por LAWSON & WANG (2001), no qual alicina foi sintetizada a partir do dissulfeto de dialila.

Inicialmente, 1 g de dissulfeto de dialila foi dissolvido à frio (4°C) em 5 mL de ácido acético glacial, sendo adicionado suavemente 1,5 mL de peróxido de hidrogênio (30%). Após 30 min, a temperatura foi aumentada para $13 \pm 1^\circ\text{C}$ e a reação foi mantida por 6 horas em agitação constante, até que o conteúdo de dissulfeto de dialila diminuiu para aproximadamente 75-80%. A reação foi interrompida com adição de 15 mL de água, seguida de extração com 30 mL de diclorometano. O ácido acético glacial foi removido pela lavagem do extrato por três vezes consecutivas com bicarbonato de sódio a 5% e então lavado com água deionizada até que o pH atingisse valores entre 6 a 7. Posteriormente, o solvente foi evaporado, utilizando um evaporador rotatório (TE20, Tecnal). A alicina foi redissolvida em 500 mL de água deionizada e o dissulfeto de dialila remanescente e outras possíveis impurezas de baixa polaridade foram removidos por duas extrações com hexano. A quantidade de hexano utilizada correspondeu a 10% do total do subproduto da solução. A solução de alicina foi mantida a 4°C por 2 meses.

A estabilidade da solução final depende do armazenamento. Se for mantida a temperatura ambiente, poderá ser utilizada até 24 h após o preparo, caso seja mantida a 4°C, sua duração é prolongada por dois meses.

O padrão de alicina foi determinado por CLAE de acordo com KOCH & LAWSON (1996).

2.1.2.3 Análise cromatográfica

As análises dos produtos inicial, intermediários e final da reação foram conduzidas por CLAE. Utilizou-se cromatógrafo SHIMADZU LC-10AC (Tóquio, Japão), montado com pré-coluna C₁₈, coluna C₁₈ em fase reversa com 150 mm de comprimento, 4,6 mm de diâmetro interno e 5 µm, injetor com "loop" de 25 µL e detector de UV-arranjo de fotodiodo, no comprimento de onda de 240 nm. A fase móvel foi constituída de metanol-água, na proporção de 50:50, fluxo de 1,0 mL/min e temperatura do forno de $28 \pm 0,2^\circ\text{C}$.

2.1.2.4 Curva padrão

Para obtenção da curva-padrão da alicina sintetizada, foram feitas leituras, em espectrofotômetro, nos comprimentos de onda de 240 nm e 254 nm e calculada a razão de absorvância (240nm/254nm). O cálculo da concentração de alicina (C) na solução seguiu a seguinte equação:

Equação 8:

$$E = \frac{\text{Absorbância} \times (10000)}{1\text{cm} \times C(\mu\text{g/mL})}$$

E = coeficiente de extinção para alicina em água de 145,4 (1 cm célula e leitura a 240 nm);

Absorbância = valor da razão de absorvância.

Posteriormente, diluições foram feitas para as concentrações de 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 $\mu\text{g/mL}$ e analisadas por CLAE, para a construção da curva padrão (Equação 9) (INSTITUTE NUTRACEUTICAL ADVANCEMENT, 2005).

Equação 9:

$$y = 87338x - 46478 \quad R^2 = 0,9981$$

sendo:

y = valor da área total

x = teor de alicina

R^2 = coeficiente de determinação do modelo

Os resultados obtidos foram expressos em microgramas (μg) por 25 mL do extrato aquoso.

2.1.2.5 Determinação da pureza

A pureza cromatográfica é utilizada como critério de aceitação para a solução padrão. A porcentagem de impurezas por área de pico deve ser <12% para a solução de alicina ser utilizada como solução padrão (INSTITUTE NUTRACEUTICAL ADVANCEMENT, 2005).

A pureza (% m/m) foi determinada por CLAE nas condições descritas acima, utilizando o coeficiente de extinção para ajoeno, 8730 M^{-1} (37,3 mL/mg), a principal impureza.

2.1.3 Resultados e Discussão

Foram analisados os principais cromatogramas para confirmar a síntese da alicina. A alicina foi sintetizada a partir do padrão de dissulfeto de dialila (Figura 12). Após 6 horas do processo de oxidação, o dissulfeto de dialila foi convertido em novos compostos intermediários (Figura 13). Após a retirada de todo ácido acético com bicarbonato de sódio a 5% e água deionizada foi identificado o pico da alicina com 7,083 min (Figura 14). Já na fase final do processo de extração o pico da alicina se formou com 7,055 min (Figura 15). A extração com hexano eliminou possíveis impurezas (Figura 16). Segundo LAWSON *et al.* (1991) identificaram por CLAE, diferentes padrões de tiosulfonatos, entre eles, a alicina, utilizando fase móvel com metanol:água (50:50), fluxo 1,0 mL/min e 254 nm. O tempo de retenção para alicina ficou entre 7 – 8 min.

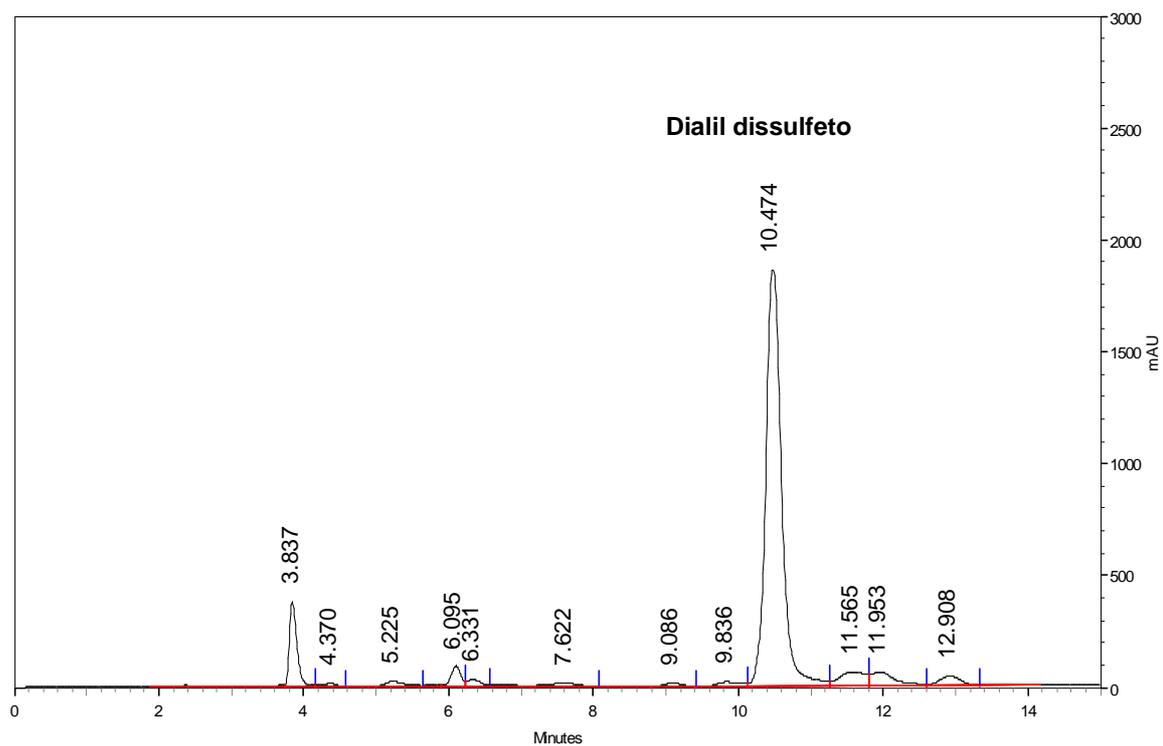


Figura 12 – Padrão cromatográfico para o dissulfeto de dialila. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

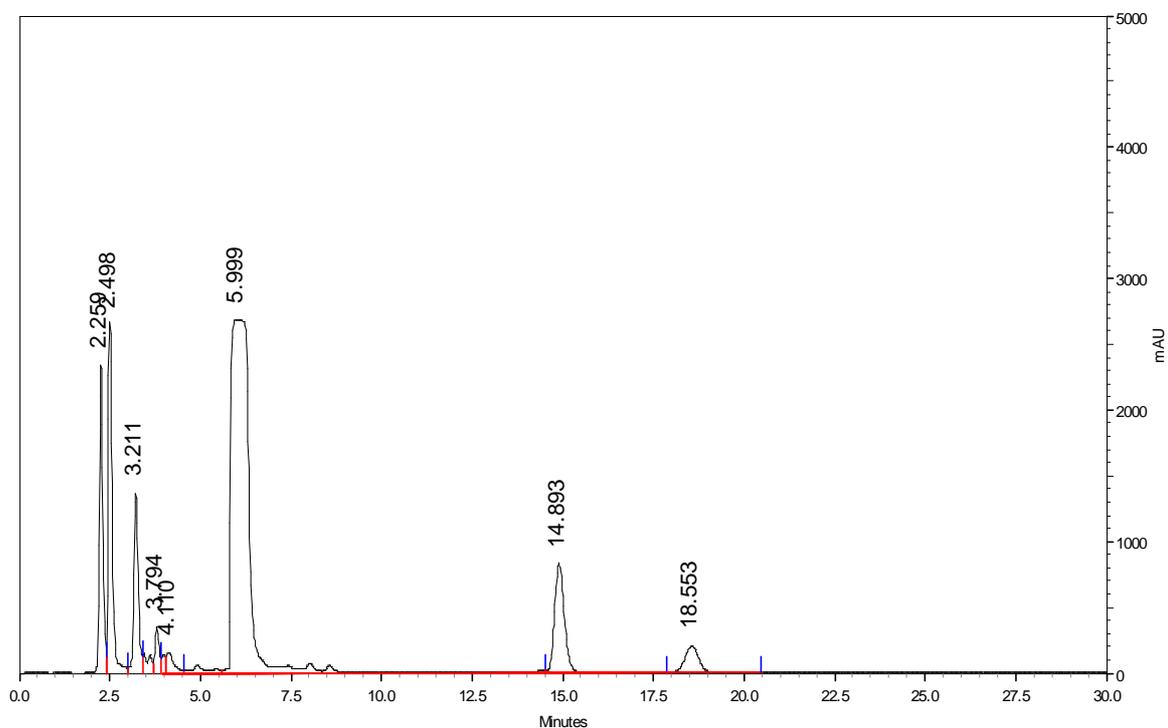


Figura 13 – Cromatograma da síntese de alicina, 6 horas depois do início da reação. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

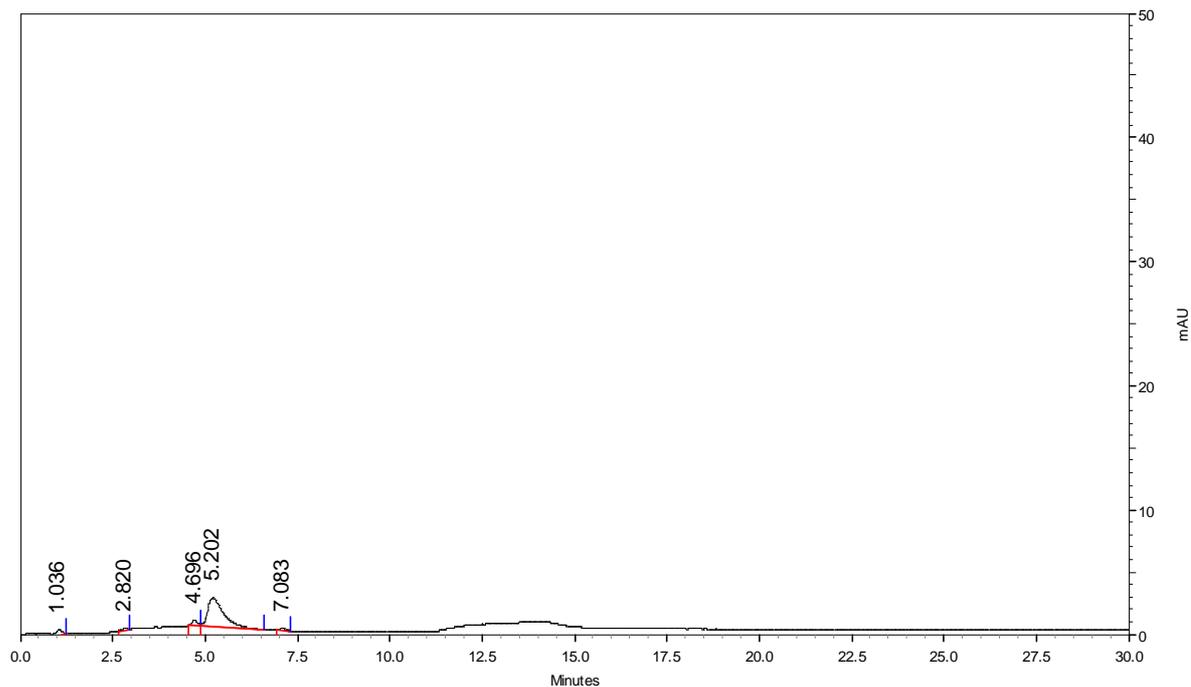


Figura 14 – Cromatograma da síntese da alicina depois da lavagem com bicarbonato de sódio e água deionizada. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

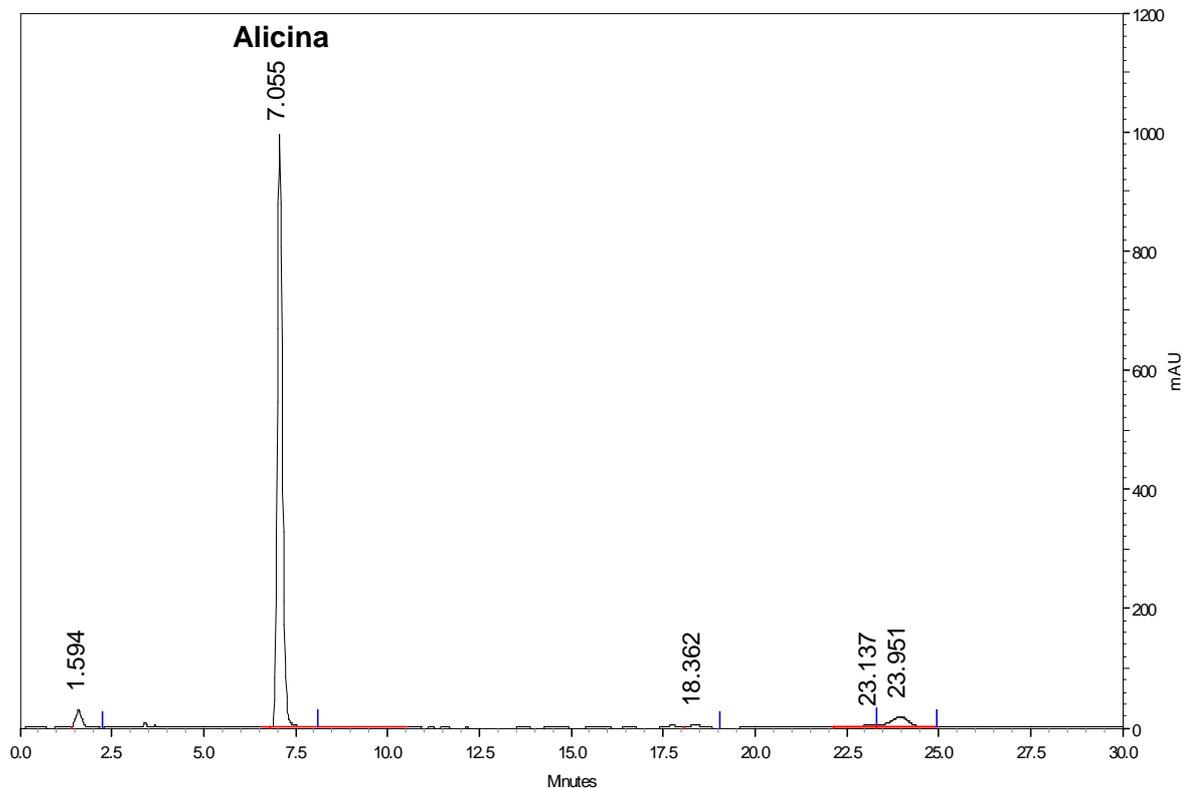


Figura 15 – Cromatograma da síntese da alicina depois da diluição com 500 mL de água deionizada. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

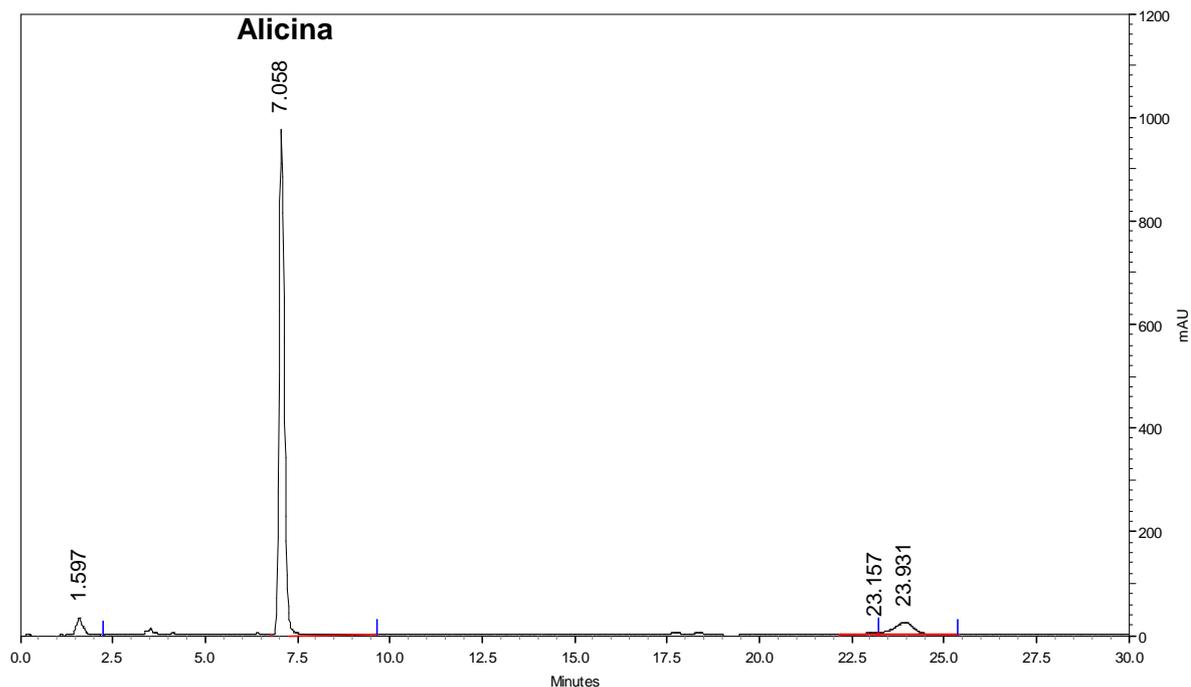


Figura 16 – Cromatograma da síntese da alicina após evaporação com hexano. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

A quantidade de impurezas formadas é sempre um problema e, usualmente, 12% está acima do limite que é aceitável para a síntese de diferentes substâncias. No presente estudo, foi observado a formação de 10,8% de impurezas.

Em geral, nas sínteses de produtos orgânicos durante suas etapas precisamos verificar se o produto desejado está sendo formado e uma das ferramentas para o sucesso deste procedimento é a utilização da CLAE.

2.1.4 Conclusão

O protocolo desenvolvido foi considerado eficiente uma vez que 88% do dissulfeto de dialila foi convertido em alicina. O presente trabalho mostrou que é possível sintetizar esta substância em laboratório e indentificar todas as etapas de transformação do dissulfeto de dialila em alicina abrindo assim, a possibilidade de sua avaliação em diferentes gêneros alimentícios.

2.1.5 Referências Bibliográficas

- BLOCK, E. The chemistry of garlic and onion. **Scientific American**, v.252, p.94, 1985.
- BLOCK, E. The organosulfur chemistry of the genus *Allium* – implications for the organic chemistry of sulfur. **Angewandte Chemie-International Edition in English**, v.31, p.1178, 1992.
- BLOCK, E.; NAGANATHAN, S.; PUTMAN, D.; ZHAO, S-H. Organosulfur chemistry of garlic and onion: Recent results. **Pure and Applied Chemistry**, v.65, n.4, p.625, 1993.
- HOLUB, B.J.; ARNOTT, K.; DAVIS, J-P; NAGPURKAR, A.; PESCHELL, J. Organosulfur compounds from garlic. In: **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. Washington, 2002. cap.2, p.213-279.
- ICHIKAWA, M.; NAGATOSHI, I.; KAZUHISA, O. Changes in Organosulfur Compounds in Garlic Cloves during Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4849-4854, 2006.
- INSTITUTE FOR NUTRACEUTICAL ADVANCEMENT. Allicin Content in Garlic by HPLC (INA Method [110.001](#)). NSF INTERNATIONAL; Allicin by high-performance liquid chromatography, INA Method 110.001, 2005. Disponível em: <http://www.nsf.org/business/ina/garlic.asp>. Acesso em: 15 jan. 2008.
- KOCH, H.P.; LAWSON, L.D. **Garlic, the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species**. in: Reford, D.C. (Ed.), Williams and Wilkins, Baltimore 1996, 1-233.
- KREST, I.; KEUSGEN, M. Quality of herbal remedies from *Allium sativum*: differences between garlic powder and fresh garlic. **Planta Medica**, v.65, n.2, p.39, 1999.
- LAWSON, L.D.; WANG, Z.J. Low allicin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of alliinase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.2592-2599, 2001.

- LAWSON, L.D.; WANG, Z-Y.J.; HUGHES, B.G. γ -Glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other *Allium* spp: Precursors of age-dependent trans-1-propenyl thiosulfinates. **Journal of Natural Products**, v.54, p.436-444, 1991.
- MICHAEL, E.R.; ELIZABETH, M. C.; JAMES, M.H. Quantitative determination of allicin in garlic: Supercritical fluid extraction and standard addition of alliin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.682, 2004.
- RYBAK, M.E.; CALVEY, E.M.; HARNLY, J.M. Quantitative determination of allicin in garlic: supercritical fluid extraction and standard addition of alliin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.682-687, 2004.
- TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. Organosulfur compounds from alliaceae in the prevention of human pathologies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.58, p.183-193, 2004.

2.2 CAPÍTULO 2

Caracterização físico-química e funcional do alho fresco e liofilizado

RESUMO

O alho é considerado uma planta medicinal e seus efeitos benéficos à saúde são atribuídos aos compostos organossulfurados, particularmente aos tiosulfonatos. O objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas (teor de umidade, sólidos solúveis, acidez titulável e pH) e funcionais (conteúdo de alicina, atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico e compostos fenólicos totais) de bulbos de alho fresco e após processamento (liofilizado), das cultivares nacional (Caçador e Peruano) e da cultivar Jinxiang, importada da China. O delineamento foi conduzido inteiramente casualizado, com três repetições. Os resultados mostraram que não houve diferença significativa nos teores de umidade, sólidos solúveis e pH para o alho fresco nas cultivares estudadas, porém houve diferença significativa no teor de acidez titulável, sendo a cultivar Peruano com maior conteúdo. No alho fresco não houve diferença significativa no teor de alicina, mas houve diferença quanto à atividade antioxidante e compostos fenólicos totais. A cultivar Peruano apresentou menor potencial antioxidante em relação às cultivares Caçador e Jinxiang. O alho liofilizado apresentou diferença significativa nos compostos funcionais avaliados. A cultivar Jinxiang apresentou menor teor de alicina e atividade antioxidante. O processo de liofilização causou perdas significativas em relação ao teor de alicina para a cultivar Jinxiang (91%); na atividade antioxidante para as cultivares Jinxiang (66%), Caçador (53%) e Peruano (30%) e no conteúdo de compostos fenólicos totais para as cultivares Caçador (46%) e Jinxiang (40%).

Palavras-chave: *Allium sativum* L., pH, acidez, sólidos solúveis, compostos organossulfurados, atividade antioxidante.

Physico-chemical and functional characterization the fresh garlic and freeze-dried

Abstract

Garlic is considered a medicinal plant and its health benefits are attributed to organosulfur compounds, particularly the thiosulfinates. The objective of this study was to evaluate the physico-chemical (moisture content, soluble solids, acidity and pH) and functional (allicin content, antioxidant activity by the β -carotene/linoleic acid and total phenolic compounds) bulbs fresh garlic and after processing (freeze-dried) national cultivars (Peruano and Caçador) and Jinxiang cultivar, imported from China. The experiment was conducted completely randomized design with three replications. The results showed no significant differences in moisture, soluble solids and pH for fresh garlic cultivars studied, but significant difference in the level of acidity, and the Peruano cultivar with the highest content. The fresh garlic was no significant difference in the content of allicin, but differences in the antioxidant activity and phenolic compounds. Peruano cultivar showed smaller antioxidant potential in relation to the cultivars Caçador and Jinxiang. The freeze-dried garlic significant difference in functional compounds evaluated. The Jinxiang cultivar was less allicin content and antioxidant activity. The freeze-drying caused significant losses in relation to the level of allicin to Jinxiang cultivar (91%), in antioxidant activity in cultivars Jinxiang (66%), Caçador (53%) and Peruano (30%) and the content of total phenolic compounds in cultivars Caçador (46%) and Jinxiang (40%).

Keywords: *Allium sativum* L., pH, acidity, soluble solids, organosulfur compounds, antioxidant activity.

2.2.1 Introdução

O alho (*Allium sativum* L.) tem sido utilizado mundialmente e por centenas de anos com propósitos culinários e medicinais (TATTELMAN, 2005). Numerosos efeitos benéficos do alho têm sido relatados, incluindo redução de riscos de câncer e doenças cardiovasculares (RAHMAN, 2003). As propriedades benéficas têm sido atribuídas a compostos organossulfurados (COS) específicos, como sulfóxidos e γ -glutamil peptídeos que estão presentes em bulbos de alho intactos (ICHIKAWA *et al.*, 2006; HOLUB *et al.*, 2002). Quando o alho é cortado ou esmagado a enzima

aliinase presente no alho é ativada e age sobre a aliina (presente no alho intacto) para produzir alicina (BANERJEE & MAULIK, 2002). Alicina representa 70-80% do total de tiosulfonatos formados, sendo responsável pelo odor característico do alho. É altamente instável e converte rapidamente em mono-, di- e trissulfeto e outros compostos como o ajoeno (SINGH & SINGH, 2008).

O alho tem em sua composição aproximadamente 65% de água, e a quantidade em peso seco é composta de carboidratos contendo frutose, seguido por compostos contendo enxofre, proteína, fibras e aminoácidos livres (LAWSON, 1996). Também contém altos níveis de saponina, fósforo, potássio, enxofre, zinco, moderados níveis de selênio e Vitaminas A e C, e baixos níveis de cálcio, magnésio, sódio, ferro, manganês e vitaminas do complexo B; o alho também tem alto conteúdo de fenólicos. Substâncias fenólicas fazem parte de uma categoria de fitonutrientes que exercem forte propriedade antioxidante (HO, 1992). Antioxidantes são de grande importância para prevenir o estresse oxidativo que pode causar muitas doenças degenerativas (HELEN *et al.*, 2000). Estudo “*in vitro*” tem demonstrado que o extrato de alho possui capacidade de seqüestrar alguns radicais e prevenir a peroxidação lipídica. Em particular a alicina, um dos principais tiosulfonatos em alho, previne a peroxidação lipídica e tem tido efetivo poder antioxidante (OKADA *et al.*, 2006).

A dosagem efetiva do alho ainda não foi determinada. Dosagens geralmente recomendadas na literatura para adultos são de 4 g (1 a 2 dentes de alho) de alho cru por dia, 300 mg de tablete de alho em pó 2 a 3 vezes ao dia, sendo padronizado para 1,3% aliina ou 0,6% de alicina ou 7,2 g de extrato de alho por dia (TATTELMAN, 2005).

A produção mundial de alho em 2006 foi estimada em aproximadamente 15 milhões de toneladas, sendo a China o maior produtor mundial, seguido da Índia, Coréia do Sul, Rússia e Estados Unidos. Em 2006, o Brasil importou da China, 63 mil toneladas e da Argentina, 56 mil toneladas (AGRIANUAL, 2008). Os preços baixos do alho importado da China e Argentina têm dificultado a atividade no Brasil, motivo pelo qual tem diminuído a produção nacional e aumentado às importações (ANAPA, 2009).

O presente trabalho teve como objetivo caracterizar bulbos de alho fresco cultivado e comercializado no Brasil e após processamento (liofilizado) quanto às propriedades físico-químicas (teor de umidade, sólidos solúveis, acidez titulável e

pH) e funcionais (conteúdo de alicina, atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico e compostos fenólicos totais) e avaliar possíveis diferenças entre as cultivares avaliadas e processamento utilizado. A qualidade pós-colheita relaciona-se ao conjunto dessas propriedades e que tornam os produtos agrícolas apreciados como alimentos.

2.2.2 Material e Métodos

2.2.2.1 Material

Os bulbos de alho das cultivares nacional (Caçador e Peruano) foram obtidos nos campos de produção experimental da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF e produzidos em agosto de 2008 e a cultivar Jinxiang, importada da China foi obtida junto a CEASA do Distrito Federal-DF, sendo produzida em junho de 2008 e comercializada no Brasil em setembro de 2008. As amostras foram levadas para o Laboratório de Pós-Colheita da Embrapa Hortaliças, onde foram selecionadas manualmente e armazenadas a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ até o momento das análises.

A amostragem para as análises físico-químicas e funcionais foi de aproximadamente 100 g ou de 10 bulbos para cada cultivar.

2.2.2.2 Métodos

Para o alho fresco foram determinados o teor de umidade utilizando estufa Quimis, modelo Q-317B a 105°C , até peso constante (IAL, 1985); sólidos solúveis, através de leitura em refratômetro digital Atago, modelo PR-1 à temperatura de 25°C (IAL, 1985); acidez titulável expressa em meq/kg (MORETTI *et al.*, 1998) e pH (IAL, 1985).

As características funcionais foram avaliadas no alho fresco e liofilizado e constaram do teor de alicina, atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico e compostos fenólicos totais.

O teor de alicina foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo INSTITUTE FOR NUTRACEUTICAL ADVANCEMENT (2005), conforme descrito no item 1.4.2.4.9.

Para realização das análises da atividade antioxidante e conteúdo de compostos fenólicos, prepararam-se extratos etanólicos de alho a 70% (item 1.4.2.4.5).

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com o método de descoloramento do β -caroteno descrito por AMIM & TAN (2002) e com modificações de ISMAIL *et al.* (2004), conforme descrito no item 1.4.2.4.6. A atividade antioxidante (AA) foi expressa em porcentagem do descoloramento do β -caroteno, utilizando a seguinte equação:

$$AA = (1 - Ac / Aam) \times 100, \text{ em que:}$$

Ac= Absorbância (Abs) controle,

Aam= Absorbância da amostra,

Ac= (Abs inicial – Abs final).

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado com o método de SINGLETON & ROSSI (1965) e com modificações de NUUTILA *et al.* (2003), no qual se utilizou o reagente Folin-Ciocalteu (item 1.4.2.4.8). O padrão utilizado foi o ácido gálico. Os resultados obtidos foram expressos em mg de ácido gálico por 100 g de matéria seca.

Os experimentos foram realizados em delineamento inteiramente casualizado, com três repetições. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) *one-way* e a comparação entre as médias dos resultados pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p \leq 0,05$), para detectar diferenças entre as cultivares. Os resultados foram expressos em média \pm desvio padrão.

2.2.3 Resultados e Discussão

Dentre as características físico-químicas avaliadas do alho fresco somente a acidez titulável diferiu significativamente em relação às cultivares analisadas (Tabela 9).

Tabela 9 – Determinação da umidade, sólidos solúveis, acidez titulável e pH das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang.

Cultivares	Umidade (g/100g)*	Sólidos Solúveis* (°Brix)	Acidez Titulável (meq/kg)*	pH*
Caçador	64,55 ± 0,53 a	31,37 ± 0,55 a	33,33 ± 1,53 c	6,45 ± 0,075 a
Peruano	64,02 ± 0,58 a	30,60 ± 1,41 a	50,97 ± 2,11 a	6,29 ± 0,071 a
Jinxiang	66,57 ± 1,48 a	n.d.	38,00 ± 1,83 b	6,42 ± 0,066 a

* a,b Médias na mesma coluna, seguidas de letras diferentes, diferem estatisticamente entre si ao nível de 5 % ($p < 0,05$); n.d.= não detectado.

Os valores encontrados para o teor de umidade entre as cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang estão próximos ao especificado na TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (2008) e o estudo realizado por QUEIROZ (2006), visto que ambos os trabalhos foram realizados com variedades cultivadas em solo brasileiro. Todas as cultivares apresentaram valores acima do especificado pelo USDA (2008).

Com relação ao conteúdo de sólidos solúveis, não foi possível a avaliação para a cultivar Jinxiang por apresentar bulbilhos secos na parte interna e sem a presença da gema de brotação. Essa aparência indica um produto antigo, possivelmente da safra 2007 e armazenado em câmara fria a temperatura ($< -4^{\circ}\text{C}$)¹. Nesse estudo as cultivares Caçador e Peruano foram colhidas após 120 e 150 dias do plantio, respectivamente. Ambas as amostras apresentaram conteúdo de sólidos solúveis próximos ao valor encontrado por OLIVEIRA *et al.* (2003) com 134 dias de colheita. OLIVEIRA *et al.* (2003) avaliaram o teor de sólidos solúveis em quatro cultivares de alho (Gigante, Curitibanos, Gigante Lavínia e Gigante Roxo) e os valores variaram entre 31 a 36%. A época de colheita interferiu de forma significativa no teor de sólidos solúveis, verificando um aumento linear em seu teor para a colheita de bulbos de alho em estágio mais avançado. A menor concentração foi para a colheita efetuada aos 134 dias após o plantio, com média de 29% e o maior teor foi conseguido na última colheita (162 dias), quando os bulbos apresentaram características de maturação mais avançada, com média de 38%. O ponto ideal para a colheita do alho situa-se a partir da maturidade do bulbo e varia de acordo com a cultivar, estando entre 148 a 156 dias após o plantio.

Os valores de acidez titulável em (meq/kg) apresentaram diferença significativa entre as cultivares avaliadas. A cultivar Caçador apresentou menor concentração (37%) em relação a cultivar Peruano de maior concentração. A cultivar

¹ (F.V. Resende, comunicação pessoal, 16 de dezembro de 2009).

Jinxiang apresentou concentração intermediária. OLIVEIRA *et al.* (2003) não verificaram diferença significativa quanto à acidez total titulável entre as cultivares de alho estudadas (Gigante, Curitibanos, Gigante Lavínia e Gigante Roxo), a acidez variou de 0,4 a 0,5%. Diferenças significativas foram observadas somente entre os pontos de colheita, a partir dos 134 dias, os teores de acidez total titulável se elevaram até a data da última colheita, aos 162 dias após o plantio. Estes resultados de acidez são semelhantes aos valores encontrado neste estudo para a cultivar Peruano.

Entre todas as cultivares estudadas, não houve diferença significativa para o pH. OLIVEIRA *et al.* (2003) estudaram o pH das cultivares de alho (Gigante, Curitibanos, Gigante Lavínia e Gigante Roxo) e observaram uma variação de 6,45 a 6,54. Esses dados se aproximaram dos resultados das cultivares Caçador e Jinxiang.

Quanto ao teor de alicina não houve diferença significativa entre as cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang para o alho fresco, porém houve diferença significativa para o alho liofilizado (Tabela 10).

Tabela 10 – Resultados do teor de alicina das amostras de extrato aquoso de alho fresco e liofilizado.

Cultivares	Tipo de processamento		
	Alho fresco*	Alho liofilizado*	
	(mg/g do produto M.F.)	(mg/g do produto M.S.)	(mg/g do produto M.S.)
Caçador	6,54 ± 0,08 a	18,61 ± 0,10 a	21,64 ± 1,15 b
Peruano	7,90 ± 0,09 a	21,95 ± 2,65 a	27,04 ± 0,32 a
Jinxiang	6,73 ± 0,03 a	20,04 ± 0,49 a	1,88 ± 0,26 c

* a,b Médias na mesma coluna, seguida de letras diferentes, diferem estatisticamente entre si ao nível de 5 % ($p < 0,05$). M.F.=matéria fresca e M.S.= matéria seca.

Os dados obtidos neste estudo para o teor de alicina em alho fresco foram superiores aos encontrados por LAWSON *et al.* (1991b), o qual encontrou valores de 3,60 mg/g para dentes de alho fresco e picado. YIN & CHENG (1998) que identificaram valores de $3,48 \pm 0,15$ mg/g no produto fresco. Outro trabalho realizado por LAWSON *et al.* (1991a) indicou o conteúdo de tiosulfonatos, incluindo a alicina de 17 variedades de alho obtidas nos Estados Unidos, China, União Soviética,

Iugoslávia, Polônia e Síria, em que os valores variaram de 1,28 mg/g produto fresco para a cultivar da Síria à 6,63 mg/g produto fresco para a cultivar da China (variedade Laotuoxu). As demais cultivares da China apresentaram os seguintes resultados em mg/g do produto fresco: Haisuan = 5,14, Caosuan = 6,36, Gaojiaozi = 4,97 e Baisuan = 4,30. De acordo com os resultados encontrados para as cultivares Jinxiang e Caçador, observou-se que os teores de alicina apresentaram valores próximos aos encontrados por LAWSON (1991a). Para a cultivar Peruano, verificou-se que esta apresentou um teor de 19% acima, em relação ao valor máximo encontrado por LAWSON (1991a). As diferenças entre os estudos podem ser devidas à variedade e sistema de cultivo sob o qual o produto foi produzido.

Para os resultados obtidos quanto ao teor de alicina para o alho liofilizado observou-se que a cultivar Peruano foi a que apresentou maior conteúdo de alicina. A cultivar Jinxiang apresentou teor de alicina muito abaixo dos valores encontrados para as cultivares nacionais, cerca de 93% em relação a cultivar Peruano. A diferença se deve à instabilidade da alicina que pode variar durante o processamento (FREEMAN & KODERA, 1995). Segundo LAWSON & HUGHES (1992) o valor encontrado de alicina em alho em pó correspondeu a 7,52 mg/g pó, sendo o processamento obtido por secagem a 60°C até peso constante de fatias de alho, com 3 mm de espessura. O tempo de secagem correspondeu a aproximadamente 57 horas e foi seguida de pulverização utilizando um moinho. O extrato de alho em pó foi obtido da adição de água (20 mL/g) e incubado a 23°C por 5 min. No mesmo estudo, os autores avaliaram os efeitos da secagem do alho na produção de tiosulfonatos. A quantidade de alicina formada no produto fresco correspondeu a 12,1 mg/g produto em matéria seca e no alho em pó foi de 11,6 mg/g pó. A perda obtida pela secagem foi de 4%. Neste estudo foram obtidos valores maiores tanto no produto fresco como no alho em pó em relação ao estudo conduzido por LAWSON & HUGHES. O processo de liofilização aumentou o teor de alicina nas cultivares Caçador (16%) e Peruano (23%) em relação ao produto fresco em matéria seca. Esse aumento pode ser devido à instabilidade da alicina que pode ter variado durante as análises. A cultivar Jinxiang houve perda no processamento de 91%. A diferença entre os estudos pode ser devida à variedade do produto. Segundo HOLUB (2002), problemas aumentam quando diferentes métodos de secagem são utilizados. A homogeneização do alho por *spray-drier* resulta na perda da atividade da enzima aliinase, o mesmo ocorrendo com métodos de secagem em

temperaturas muito altas. Secagem em forno a temperaturas baixas (<60°C) tem pouco efeito na produção dos principais tiosulfonatos (alicina e alil metil tiosulfonato).

Em outro estudo LAWSON *et al.* (1991a) avaliaram a composição dos principais tiosulfonatos, entre eles a alicina presentes em tabletes de alho em pó comercializados no mercado da Austrália, Alemanha, Estados Unidos e Japão. Os valores encontrados corresponderam a 3,60 mg/g produto (Austrália); 3,10 mg/g produto (Estados Unidos); 0,26 a 2,55 mg/g produto (Alemanha) e não detectado (Japão). Segundo os autores, essa ampla variação foi devida a procedimentos diferentes de processamento utilizado no preparo do alho em pó.

O alho em pó tem o potencial de preservar a capacidade de liberação da alicina do alho, entretanto enquanto alguns alhos em pó liberam grande quantidade de alicina em contato com a água, muitos não indicam variação nos métodos de produção de alho em pó (LAWSON *et al.*, 1991a). Desta forma, podemos considerar possíveis variações nos resultados.

Com relação a atividade antioxidante, observou-se uma diminuição nos valores de absorbância do β -caroteno na ausência de extrato de alho, devido à oxidação do pigmento carotenóide pelo ácido linoléico, de acordo com a curva do descoloramento do β -caroteno na presença do padrão BHT das amostras de extrato do alho fresco quando comparadas com o controle (Figura 17).

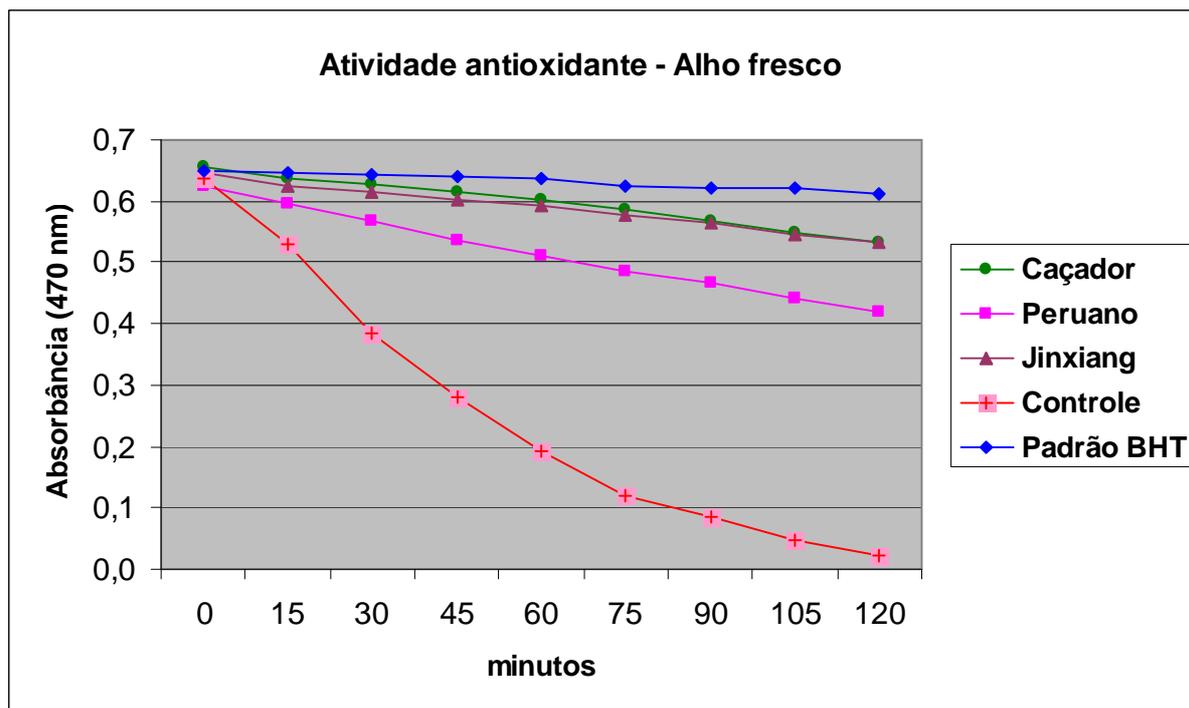


Figura 17 – Curva de descoloramento do β -caroteno das amostras de alho fresco, das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang, do controle e do padrão BHT. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

Os valores de absorvância do controle foram significativamente menores ($p < 0,05$) em relação aos extratos etanólicos de alho e o padrão BHT. As amostras das cultivares Caçador e Jinxiang apresentaram alto valor de absorvância indicando que os extratos de alho fresco possuíam atividade antioxidante. Houve diferenças significativa entre a cultivar Peruano para atividade antioxidante em relação as cultivares Caçador e Jinxiang. Verificou-se que as cultivares Caçador e Jinxiang, apresentaram maior inibição do descoloramento do β -caroteno em relação a cultivar Peruano, apresentando diferença significativa entre elas, indicando também possuir atividade antioxidante, porém em menor concentração em relação as demais cultivares. Este resultado sugere que diferentes cultivares de alho possuem diferentes atividades antioxidantes.

As amostras de alho liofilizado das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang apresentaram perfil similar, porém houve decaimento nos valores de absorvância no decorrer dos 120 min, sendo de aproximadamente 60% para as cultivares Caçador e Jinxiang e de 20% para a cultivar Peruano, indicando uma queda na atividade antioxidante em relação ao alho fresco (Figura 18). Portanto, o processamento influenciou na perda da atividade antioxidante.

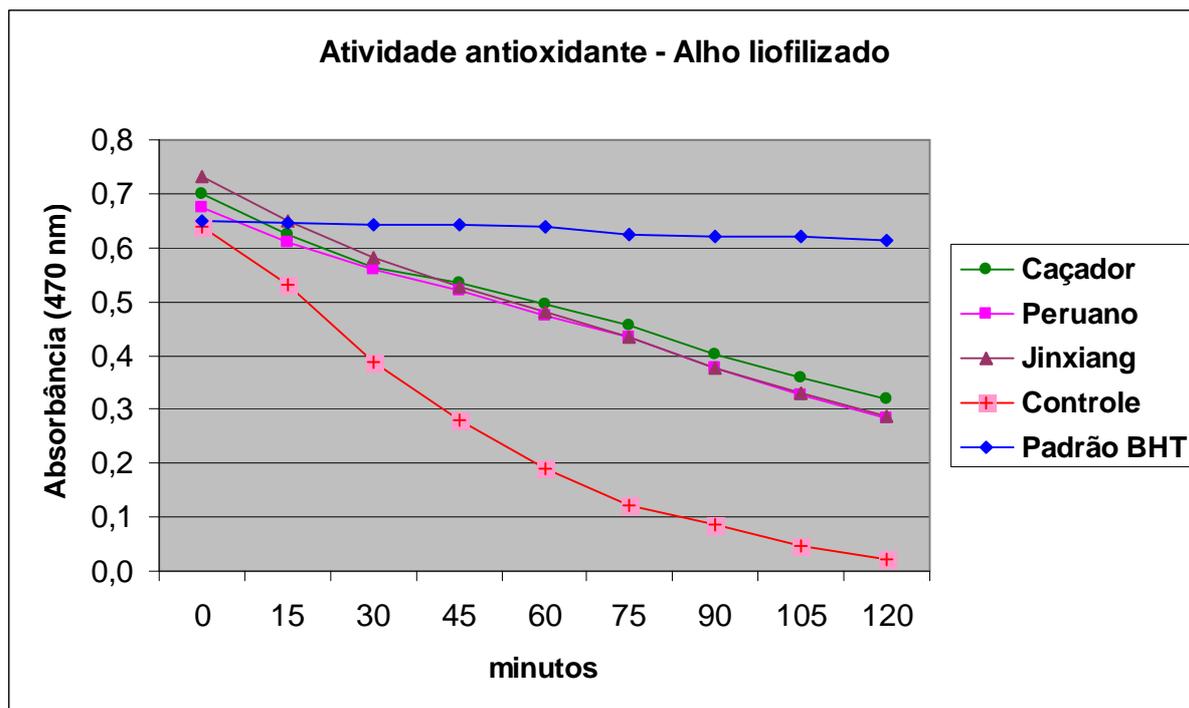


Figura 18 – Curva de decoloração do β -caroteno das amostras de alho liofilizado, das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang, do controle e do padrão BHT. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

Todos os extratos etanólicos das amostras de alho apresentaram valores inferiores ao padrão (BHT). Esta diferença pode ser devida à pureza do padrão (BHT), que foi usado na forma pura, enquanto que nas amostras de alho contêm, em seus extratos, outras substâncias além dos compostos antioxidantes (QUEIROZ, 2006).

A comparação das médias da atividade antioxidante dos extratos etanólicos de alho fresco e liofilizado das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang estão representados na Figura 19.

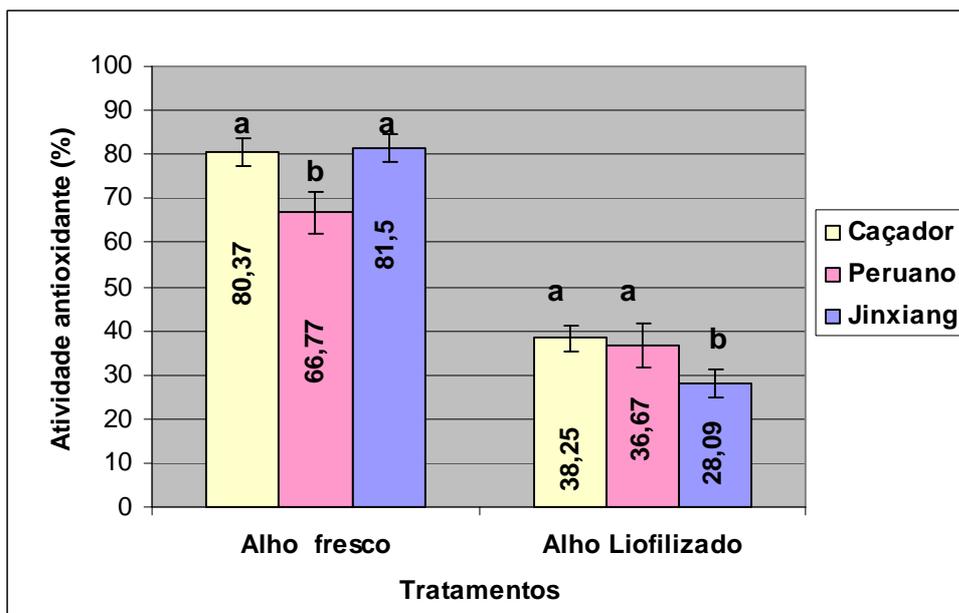


Figura 19 – Média da atividade antioxidante total dos extratos etanólico de alho fresco e liofilizado, medida pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico. Resultados referente a média de três determinações. Letras iguais significam que não houve diferença significativa entre as amostras avaliadas no mesmo tratamento e letras diferentes, diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% ($p < 0,05$). Barras verticais representam o desvio padrão da média. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

Os resultados da ANOVA indicaram que houve diferença significativa na atividade antioxidante para o tratamento de alho fresco entre as cultivares Peruano com Caçador e Jinxiang e para o tratamento do alho liofilizado entre as cultivares Jinxiang com Caçador e Peruano. Houve redução significativa na atividade antioxidante entre os tratamentos para todas as cultivares avaliadas. A cultivar Jinxiang apresentou maior perda (66%) após o processo de liofilização, seguida das cultivares Caçador (53%) e Peruano (42%).

No estudo realizado por KAUR & KAPOOR (2002), a atividade antioxidante para o extrato etanólico de alho foi de 62%, com extração do solvente de 80%, e para o extrato aquoso de 62%. QUEIROZ (2006) verificou que a inibição da oxidação lipídica (IOL) apresentou 36% para o extrato metanólico do alho fresco com extração do solvente de 70%. Os resultados encontrados para as cultivares estudadas estão acima dos dados de literatura para o alho fresco.

A atividade antioxidante de extratos de vegetais depende do tipo de polaridade de extração do solvente, dos procedimentos de isolamento e da pureza de composto ativos, e também do uso de técnicas de ensaio e do substrato. A variedade e tipo da amostra, a composição do solo e as condições climáticas

também podem apresentar uma ampla variação na composição química do alho (MEYER *et al.*, 1998; HOLUB, 2002). Entre estas, podem estar as possíveis diferenças de resultados do nosso estudo em relação aos dados de literatura.

Verificou-se que houve diferença significativa para os valores dos compostos fenólicos totais (Figura 20) em (mg de ácido gálico/100 g de matéria seca) da cultivar Jinxiang para cultivares Caçador e Peruano para o alho fresco. A cultivar Jinxiang apresentou maior conteúdo de fenólicos totais.

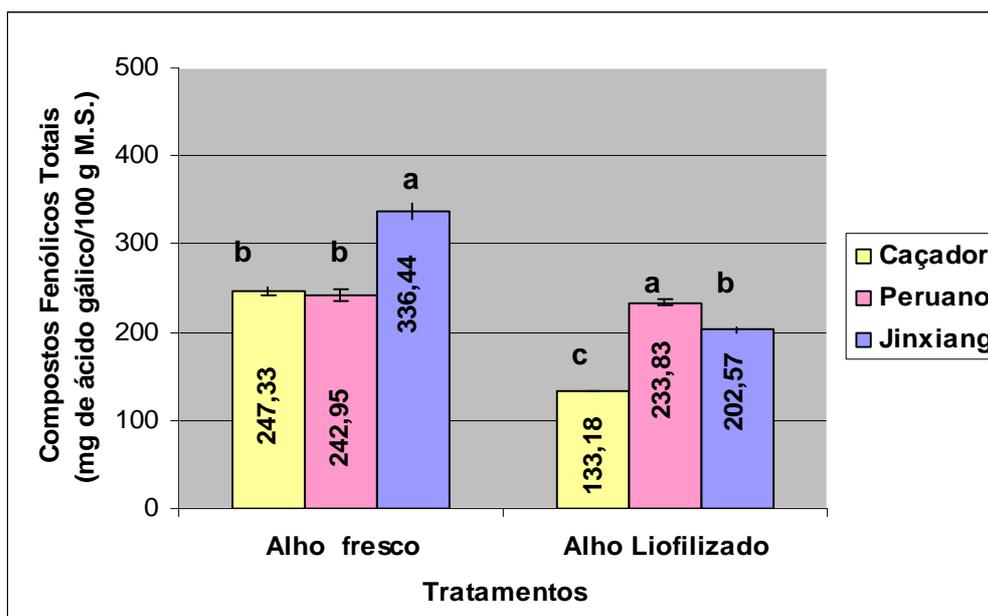


Figura 20 – Média do conteúdo de compostos fenólicos totais dos extratos etanólico de alho fresco e liofilizado. Resultados referente a média de três determinações. Letras iguais significam que não houve diferença significativa entre as amostras avaliadas no mesmo tratamento e letras diferentes, diferem estatisticamente entre si ao nível de 5% ($p < 0,05$). M.S.=matéria seca. Barras verticais representam o desvio padrão da média. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

Houve perda de aproximadamente 46% e 40% do alho liofilizado para o alho fresco das cultivares Caçador e Jinxiang, respectivamente. O alho da cultivar Peruano não apresentou perda significativa entre os tratamentos.

Os resultados encontrados para compostos fenólicos totais para o alho fresco da cultivar Caçador foram estatisticamente idênticos aos observados por QUEIROZ (2006). Por outro lado, os valores verificados no presente estudo para as cultivares Peruano e Jinxiang foram 28% menores e 51% maiores, respectivamente. KAUR & KAPOOR (2002) identificaram fenólicos totais em diversos vegetais, inclusive o alho fresco. Os valores encontrados para o alho foram de $145,0 \pm 5,9$ mg de catecol/100g

do produto. Neste caso, o padrão utilizado foi o catecol e no nosso estudo foi o ácido gálico. BOZIN *et al.* (2008) avaliaram o conteúdo de fenólicos totais em bulbos de alho maduros e imaturos colhidos 3 meses antes de atingir a maturidade. As amostras foram trituradas a seco. Avaliaram também bulbos de alho fresco, utilizando o método da maceração com metanol 80%. Os resultados apresentados foram para o alho imaturo de $98 \pm 0,4$ mg de ácido gálico/g extrato; alho maduro de $18 \pm 0,6$ mg de ácido gálico/g extrato e para o alho fresco de $5 \pm 0,5$ mg de ácido gálico/g extrato. Os autores relataram que as diminuições do conteúdo de fenólicos totais foram provavelmente causadas pelo aumento de compostos organossulfurados e substâncias terpenóides presentes no óleo essencial de bulbos de alho maduros. Os valores de compostos fenólicos totais encontrados neste estudo para as cultivares estudadas foram menores ao encontrado por BOZIN *et al.* (2008) para o alho fresco.

Com relação ao conteúdo de compostos fenólicos totais no alho em pó liofilizado, os resultados deste estudo foram superiores ao encontrado por NUUTILA *et al.* (2003), cujos valores variaram de 9,5 a 11,5 mg ácido gálico/100 g de extrato; BENKEBLIA (2005), na qual variou de 7,5 a 11,5 mg ácido clorogênico/100 g extrato e TANGKANAKUL *et al.* (2009) que encontrou $63,51 \pm 3,67$ mg de ácido gálico/100 g de extrato. O solvente utilizado nesses estudos foi o metanol.

Sugere-se que as diferenças entre os estudos sejam devidas às características genéticas, climáticas, de solo ou ainda, em função do método de análise empregado e solvente utilizado. Segundo BENKEBLIA (2005), além dos compostos fenólicos, os compostos organossulfurados poderiam estar envolvidos na avaliação das propriedades antioxidantes.

2.2.4 Conclusão

Para a caracterização físico-química e funcional do alho fresco e liofilizado das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang, observou-se que não houve diferença significativa nos teores de umidade, sólidos solúveis e pH para o alho fresco nas cultivares estudadas, porém houve diferença significativa no teor de acidez titulável. A cultivar Peruano apresentou maior teor de acidez em relação as demais cultivares.

Quanto ao teor de alicina as amostras de alho fresco não apresentaram diferença significativa entre as cultivares avaliadas, mas houve diferença entre as

amostras de alho liofilizado, sendo a cultivar Peruano com maior conteúdo de alicina, seguido pela cultivar Caçador.

As cultivares de alho apresentaram diferença significativa na atividade antioxidante. As cultivares Peruano e Jinxiang apresentaram menor potencial antioxidante para o alho fresco e para o alho liofilizado, respectivamente.

Houve diferença significativa no conteúdo de compostos fenólicos totais entre as amostras de alho fresco e liofilizado. As cultivares Jinxiang e Peruano apresentaram maior conteúdo de fenólicos para o alho fresco e liofilizado, respectivamente.

O processo de liofilização causou redução significativa nos teores de alicina para a cultivar Jinxiang (91%); na atividade antioxidante para as cultivares Jinxiang (66%), Caçador (53%) e Peruano (30%) e no conteúdo de compostos fenólicos totais para as cultivares Caçador (46%) e Jinxiang (40%).

O processo de liofilização aumentou os teores de alicina para as cultivares Caçador (16%) e Peruano (23%) e não afetou o conteúdo de compostos fenólicos totais para a cultivar Peruano.

É possível que o alho da cultivar Jinxiang adquirido como sendo da safra de 2008, seja da safra de 2007; tenha sido armazenado em câmara fria em temperaturas baixas (<-4°C) e utilizado anti-brotantes, pois, os dentes de alho apresentaram secos e com ausência da gema de brotação, podendo ter ocasionado após processamento liofilizado, perdas significativas nos teores de alicina, atividade antioxidante e compostos fenólicos totais.

Com relação as cultivares Caçador e Peruano os resultados mostram que a atividade antioxidante seja proveniente da alicina, sendo a cultivar Peruano mais resistente ao processamento.

2.2.5 Referências Bibliográficas

AGRIANUAL. **Anuário Estatístico da Agricultura Brasileira**. São Paulo:FNP – Consultoria e comércio, 2008.

AMIM I.; TAN S.H. Antioxidant activity of selected seaweeds. **Malaysian Journal of Nutrition**, v.8, p.167-177, 2002.

- ANAPA, ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE ALHO. **Concorrência desleal desestimula produtores de alho.** Disponível em: <http://www.anapa.com.br/principal/index.php/noticias-da-anapa/642-concorrenca-desleal-desestimula-produtores-de-alho>. Acesso em: 04 abril de 2009.
- BANERJEE, S.K.; MAULIK, S.K. Effect of garlic on cardiovascular disorders: a review. **Nutrition Journal**, v.1, p.1-14, 2002.
- BENKEBLIA, N. Free-Radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, n.5, p. 753-759, 2005.
- BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SOMOJLIK, I.; GORAN, A.; IGIC, R. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). **Food Chemistry**, v.111, p.925-929, 2008.
- BRASIL. Instrução Normativa n.5, de 11 de dezembro de 2008. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária determina a lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de dez. de 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis.htm>> Acesso em: 18 mar. 2009.
- FREEMAN, F., KODERA, Y. Garlic chemistry: stability of S-(2-propenyl)-2-propene-1-sulfinothionate (allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.2332-2338, 1995.
- HELEN, A.; KRISHNAKUMAR, K.; VIJAYAMMAL, P.L.; AUGUSTI, K.T. Antioxidant effect of onion oil (*Allium cepa*, Linn) on the damage induced by nicotine in rats as compared to alpha-tocopherol. **Toxicology Letters**, v.116, p.61-68, 2000.
- HO, C.T. Phenolic compounds in food: An overview. In: HUANG, M.T.; HO, C.T.; LEE, C.Y. (eds). *ACS symposium series: 507. Phenolic compounds in food and their effects on health II: Antioxidants and cancer prevention*. Washington, DC: American Chemical Society.P.2-7, 1992.

- HOLUB, BJ; ARNOTT, K; DAVIS, J-P; NAGPURKAR, A; PESCHELL, J. Organosulfur compounds from garlic (eds). In: SHI, J, MAZZA, G, MAGUER, ML. **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. Washington: CRC. 2002, p.213-279.
- ICHIKAWA, M.; IDE, N.; ONO, K. Changes in organosulfur compounds in garlic cloves during storage. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4849-4854, 2006.
- INSTITUTE FOR NUTRACEUTICAL ADVANCEMENT. 2005. Allicin Content in Garlic by HPLC (INA Method [110.001](#)). Disponível em <http://www.nsf.org/business/ina/garlic.asp>. Acessado em 15 de Janeiro de 2008.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3ed. São Paulo, v.1, 533p, 1985.
- ISMAIL, A., MARJAN, Z.M., FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v.87, p.581-586, 2004.
- KAUR, C., KAPOOR, H.C. Anti-oxidant activity and total, phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science & Technology**,v.37, p.153-161, 2002.
- LAWSON, L.D.; HUGHES, B.G. Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic. **Planta Medica**, v.58, p.345-350, 1992.
- LAWSON, L.D.; WANG, Z.J. Low allicin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of alliinase activity. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.2592-2599, 2001.
- LAWSON, L.D.; WANG, Z-YJ.; HUGHES, B.G. γ -Glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other *Allium* spp: Precursors of age-dependent trans-1-propenyl thiosulfinates. **Journal of Natural Products**, v.54, p.436-444, 1991a.

LAWSON, L.D.; WANG, Z-YJ.; HUGHES, B.G. Identification and HPLC quantification of the sulfides and dialk(en)yl thiosulfinates in commercial garlic products. **Planta Medica**, v.57, p.363-370, 1991b.

LAWSON; L.D.The composition and chemistry of garlic cloves and processed garlic. In: KOCH, H.P.; LAWSON, L.D. (eds). **Garlic the science and therapeutic application of *Allium sativum* L and related species**. Baltimore:Williams & Wilkins. 1996, p.37-107.

MEYER, A.S.; HEINONEN, M.; FRANKEL, E.N. Antioxidant interactions of catechin, cyaniding, caffeic acid, quercetin, and ellagic acid on human LDL oxidation. **Food Chemistry**, v.61, p.71-75, 1998.

MORETTI, C.L.; SARGENT, S.A.; HUBER, D.J.; CALBO, A.G.; PUSCHMANN, R. Chemical composition and physical properties of pericarp, locule and placental tissues of tomatoes with internal bruising. **Journal of American Society for Horticultural Science**, v.123, p.656-660, 1998.

NUUTILA, A.M.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AARNI, M.; OKSMAN-CALDENTY, K-M. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.82, p.485-493, 2003.

OKADA, Y.; TANAKA, K.; SATO, E.; OKAJIMA, H. Kinetic and mechanistic studies of allicin as an antioxidant. **Organic Biomolecular Chemistry**, v.4, p.4113-4117, 2006.

OLIVEIRA, C.M.; SOUZA, R.J.; MOTA, J.H.; YURI, J.E.; RESENDE, G.M. Determinação do ponto de colheita na produção de alho. **Horticultura brasileira**, v.21, p.506-509, 2003

QUEIROZ, Y.S. **Alho (*Allium sativum*) e produtos: atividade antioxidante *in vitro* durante a vida de prateleira**. 2006. 128f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

- RAHMAN, K. Garlic and aging: New insights into and old remedy. **Ageing Research**, v.2, p.39-56, 2003.
- SINGH, V.K.; SINGH, D.K. Pharmacological effects of garlic (*Allium sativum* L.). **Annual Review of Biomedical Sciences**, v.10, p.6-26, 2008.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.
- TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS – Alho cru, 2008. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela>>. Acesso em: 09 março 2009.
- TANGKANAKUL, P.; AUTTAVIBOONKUL, P.; NIYOMWIT, B.; LOWVITON, N.; CHAROENTHAMAWAT, P.; TRAKOONTIVAKORN, G. Antioxidant capacity, total phenolic content and nutritional composition of Asian foods after thermal processing. **International Food Research Journal**, v.16, p.571-580, 2009.
- TATTELMAN, E. Health effects of garlic. **American Family Physician**, v.72, p.103-106, 2005.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA, 2008). **National Nutrient Database for Standard Reference. Release 21. Garlic. Food group:Vegetables & Veg products.** Disponível em: <www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>. Acesso em:23 mar. 2009.
- YIN, M.C.; CHENG, W.S. Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. **Journal of Food Protection**, v.61, p.123-125, 1998.

2.3 CAPÍTULO 3

Determinação físico-química e de compostos funcionais em alhos frescos nacionais e importados da China durante o armazenamento refrigerado

Resumo

O objetivo deste estudo foi determinar as características físico-químicas e o conteúdo de compostos funcionais presentes em bulbos de alho das cultivares Caçador e Peruano, originárias do Brasil e Jinxiang, da China, durante o armazenamento por até sessenta dias. Bulbos de alho foram armazenados à temperatura de $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ e umidade relativa de $70\pm 2\%$ e analisados quinzenalmente para teores de umidade, sólidos solúveis, acidez titulável, índice de pH, alicina, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante. Com relação às características físico-químicas, não houve alteração nos teores de umidade e pH para as cultivares estudadas. Houve alteração significativa quanto aos teores de acidez titulável e sólidos solúveis, indicando que essas características se alteram pelo armazenamento e entre diferentes cultivares. De maneira geral, verificou-se que as propriedades funcionais das cultivares de alho estudadas foram alteradas durante o armazenamento. Observou-se que o conteúdo de alicina para a cultivar Caçador não apresentou alterações significativas no decorrer do armazenamento. Por outro lado, as cultivares Peruano e Jinxiang mostraram redução significativa no teor de alicina a partir dos 45 e 15 dias de armazenamento, respectivamente. Para a atividade antioxidante, medida pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, as cultivares Caçador e Jinxiang apresentaram maior potencial antioxidante em relação a cultivar Peruano no início do estudo e houve redução significativa desde o início do armazenamento para todas as cultivares e a partir dos 30 dias deixou-se de observar essas diferenças. Quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais a cultivar Jinxiang apresentou os maiores teores em relação às cultivares Caçador e Peruano no início do estudo. A partir de 30 dias o teor de fenólicos foi significativamente maior na cultivar Peruano.

Palavras-chave: *Allium sativum*, alicina, compostos organossulfurados, atividade antioxidante, compostos fenólicos.

Functional compounds in garlic fresh domestic and imported from China during the cold storage

Abstract

The purpose of this study was to determine the content of functional compounds present in garlic bulbs of the cultivars Caçador and Peruano, from Brazil and Jinxiang, China, during storage for up to sixty days. Bulbs of garlic were stored at $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ and relative humidity of $70\pm 2\%$ and analyzed each fifteen days for levels of allicin, total phenolic compounds and antioxidant activity. With respect to physical-chemical characteristics, no change in moisture and pH content for the cultivars. There was a significant change for the levels of acidity and soluble solids, indicating that these characteristics are altered by the storage and among different cultivars. Overall, it was found that the functional properties of garlic cultivars studied were altered during storage. It was observed that the content of allicin to Caçador cultivar did not change significantly during storage. On the other hand, the Peruano and Jinxiang cultivars showed significant reduction in the level of allicin from 45 to 15 days of storage, respectively. For the antioxidant activity, measured by system β -carotene/linoleic acid, cultivars Caçador and Jinxiang showed higher antioxidant potential than cultivar Peruano. During the period of cold storage all cultivars showed a significant decrease for this variable. The content of total phenolic compounds, Jinxiang cultivar showed the highest levels in relation to the cultivars Caçador and Peruano. After 30 days of storage all cultivars showed a significant increase in levels of total phenolics.

Keywords: *Allium sativum*, allicin, organosulfur compounds, antioxidant activity, phenolics compounds.

2.3.1 Introdução

Alimentos funcionais fisiológicos podem ser definidos como aqueles que desempenham funções que vão além das funções nutricionais conhecidas, em função de possuírem substâncias que atuam no organismo modulando funções bioquímicas e/ou fisiológicas. Tais propriedades podem, potencialmente, resultar em maior proteção à saúde, retardando, inclusive, processos patológicos que conduzem a doenças crônicas e degenerativas (SGARBIERI & PACHECO, 1999).

Os alimentos e ingredientes funcionais podem ser classificados em dois grupos: quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem. Esses alimentos atuam em seis áreas do organismo: no sistema gastrointestinal; no sistema cardiovascular; no metabolismo de substratos; no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular; no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (SOUZA *et al.*, 2003). Os principais ingredientes funcionais presentes nos alimentos são flavonóides, fitoestrógenos, compostos organossulfurados, fibras solúveis, isotiocianatos e monoterpenos, dentre outros (KRIS-ETHERTON *et al.*, 2002).

O alho (*Allium sativum* L.) é uma hortaliça amplamente consumida em todo o mundo, cujas propriedades benéficas são reconhecidas há mais de 5000 anos (AMAGASE *et al.*, 2001). Botanicamente, é classificado na família das liliáceas, que possui mais de 700 espécies, incluindo cebola, alho poró e cebolinha (HOLUB *et al.*, 2002).

O alho contém 33 compostos organossulfurados (COS), sendo que 1 g de alho fresco contém de 11 a 35 mg dessas substâncias; possui ainda quase quatro vezes mais COS (por grama de peso fresco) do que a cebola, brócolis, couve-flor e damasco (HOLUB *et al.*, 2002). Dentre os compostos com elevado valor funcional nos bulbos destaca-se a alicina (dialil tiosulfonato), um líquido volátil responsável pelo odor pungente do alho. Quimicamente, a alicina é uma molécula instável e altamente reativa. É o composto bioativo mais comum e representa cerca de 70% dos compostos sulfurados presentes nesta hortaliça.

Quando os bulbos de alho são cortados ou esmagados, a alicina é produzida enzimaticamente pela interação do aminoácido não protéico aliina [(+)-S-allil-L-sulfóxido cisteína], abundante nos dentes de alho, com a enzima aliinase (Figura 21). Durante a reação enzimática, amônio e piruvato também são formados. Elementos responsáveis pela quebra da alicina são o ar, a água e temperaturas elevadas (MIRON *et al.*, 2002, 2004; BAGHALIAN *et al.*, 2005; SANCE *et al.*, 2006).

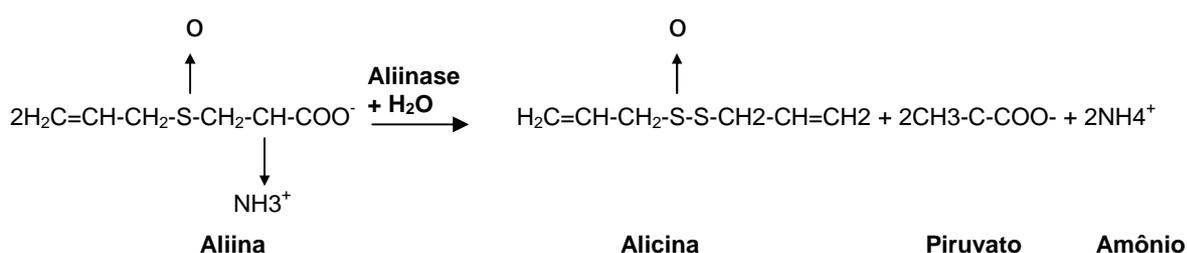


Figura 21 – Transformação da aliina em alicina por via enzimática (LI *et al.*, 2007).

As respostas fisiológicas do alho têm sido amplamente atribuídas à redução de fatores de riscos para doenças cardiovasculares e câncer, estímulo da função imune, aumento da detoxificação de compostos estranhos, proteção hepática, efeito antimicrobiano e efeito antioxidante (EL-DEMERDASH *et al.*, 2005).

Há uma grande variabilidade no conteúdo de alicina e de outros COS no alho. Tal conteúdo é dependente da cultivar, da composição do solo, condições climáticas, época de colheita e manuseio pós-colheita. Com relação à época de colheita e manuseio pós-colheita, a quantidade de aliina e γ -glutamilcisteínas presentes em bulbos de alho aumentam nas quatro semanas que antecedem a época da colheita. Durante o processo de cura (plantas secas à sombra ou ao sol por até duas semanas) essas substâncias aumentam em aproximadamente 25%. Um atraso na colheita de duas semanas aumenta o conteúdo desses compostos, correspondendo um adicional de 20% da massa, em base seca (HOLUB *et al.*, 2002).

Apesar de todos os estudos desenvolvidos em várias partes do mundo envolvendo a cultura do alho, há poucos trabalhos publicados acerca do conteúdo de substâncias bioativas em bulbos de alho e armazenamento pós-colheita. HUGHES *et al.* (2006) indicam claramente a necessidade de uma maior quantidade de estudos enfocando essa questão. Os autores citam que tanto a indústria alimentícia como farmacêutica iria se beneficiar de ter mais informações detalhadas nas variações dentro bulbos de alho e a mudança que ocorre após estocagem para que recomendações específicas possam ser feitas para atender as necessidades de cada indústria.

O presente trabalho teve como objetivo determinar as alterações físico-químicas e os principais compostos funcionais em bulbos de alho armazenados sob refrigeração.

2.3.2 Material e Métodos

2.3.2.1 Material

Bulbos de alho (*Allium sativum* L.) das cultivares brasileira (Caçador e Peruano) foram obtidos nos campos experimentais da Embrapa Hortaliças, Brasília, DF. Bulbos da cultivar Jinxiang, importada da China, foram adquiridos na CEASA-

DF. Todos os materiais utilizados foram da safra 2008. Os materiais foram selecionados, classificados e armazenados a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ de umidade relativa por 60 dias. A cada quinze dias, durante um período de sessenta dias, amostras dos bulbos foram retiradas para análises.

A amostragem para as análises físico-químicas e funcionais foi de aproximadamente 100 g ou de 10 bulbos para cada cultivar.

2.3.2.2 Métodos

2.3.2.2.1 Determinação físico-química

Foram determinados o teor de umidade utilizando estufa Quimis, modelo Q-317B a 105°C , até peso constante (IAL, 1985); sólidos solúveis, através de leitura em refratômetro digital Atago, modelo PR-1 à temperatura de 25°C (IAL, 1985); acidez titulável expressa em meq/kg (MORETTI *et al.*, 1998) e pH (IAL, 1985).

2.3.2.2.2 Determinação do teor de alicina

O teor de alicina foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo INSTITUTE FOR NUTRACEUTICAL ADVANCEMENT (2005), conforme descrito no item 1.4.2.4.9.

A solução padrão de alicina foi obtida pela oxidação do dissulfeto de dialila segundo método descrito por LAWSON & WANG (2001), na qual alicina foi sintetizada a partir do dissulfeto de dialila, conforme descrito no item 1.4.2.4.9.1.

O extrato etanólico de alho foi obtido para determinação das análises da atividade antioxidante e compostos fenólicos totais (item 1.4.2.4.5).

2.3.2.2.3 Determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com o método de descoramento do β -caroteno descrito por AMIM & TAN (2002) e com modificações de ISMAIL *et al.* (2004), conforme descrito no item 1.4.2.4.6. A atividade antioxidante

(AA) foi expressa em porcentagem do descolorimento do β -caroteno, utilizando a seguinte equação:

$$AA = (1 - Ac / Aam) \times 100, \text{ em que:}$$

Ac= Absorbância (Abs) controle,

Aam= Absorbância da amostra e

Ac= (Abs inicial – Abs final).

2.3.2.2.4 Determinação de compostos fenólicos totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado com o método de SINGLETON & ROSSI (1965) e com modificações de NUUTILA *et al.* (2003), no qual se utilizou o reagente Folin-Ciocalteu (item 1.4.2.4.8). O padrão utilizado foi o ácido gálico. Os resultados obtidos foram expressos em mg de ácido gálico por 100 g de matéria seca.

2.3.2.2.5 Delineamento experimental

O delineamento experimental foi inteiramente casualizado arranjado em esquema fatorial 3 x 5 (três cultivares de alho e 5 tempos de análises), com três repetições. As análises foram realizadas em triplicata, sendo os resultados expressos em média \pm desvio padrão. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste de normalidade e a comparação entre as médias dos resultados foi realizada pelo teste de Tukey, ao nível de 5% de significância ($p \leq 0.05$), para detectar diferenças durante o período de armazenamento.

2.3.3 Resultados e Discussão

Com relação ao teor de umidade, bulbos de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang apresentaram inalterados durante os 60 dias de armazenamento, porém a cultivar Peruano superou significativamente as demais cultivares com 15 e 30 dias de avaliação (Figura 22).

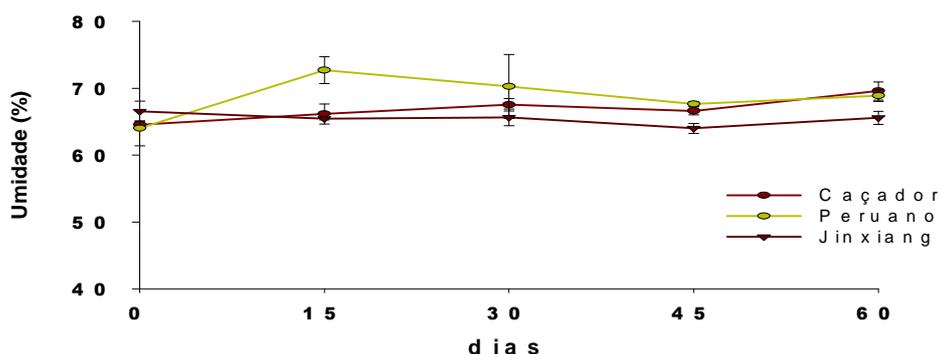
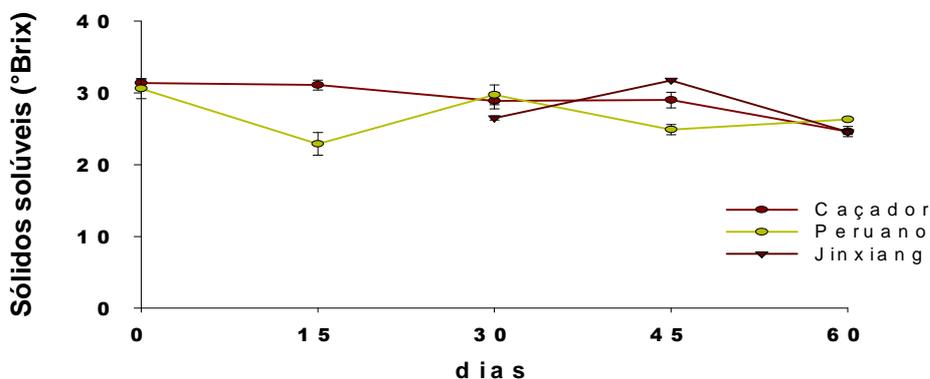


Figura 22 – Variações no teor de umidade (%) das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR. Barras verticais representam o desvio padrão da média. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

Os resultados indicam variabilidade na amostra e uma tendência das cultivares Caçador e Peruano a aumentarem o teor de umidade durante o armazenamento. Para a cultivar Jinxiang não houve essa tendência. No final do armazenamento as cultivares Caçador e Peruano apresentaram valores próximos ao especificado na TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS (2008) e no estudo de QUEIROZ (2006).

Houve redução significativa na concentração de sólidos solúveis para a cultivar Caçador a partir dos 30 dias de armazenamento. A cultivar Peruano manteve-se inalterada durante o estudo (Figura 23).



Alho Chinês: 0 e 15 dias não foi detectado o conteúdo de sólidos solúveis.

Figura 23 – Variações no conteúdo de sólidos solúveis das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR. Barras verticais representam o desvio padrão da média. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

Não foi possível avaliação a avaliação da cultivar Jinxiang nos tempos 0 e 15 dias, devido apresentar bulbilhos secos e ausência de gema de brotação. Essa aparência indica um produto antigo, possivelmente da safra 2007 e armazenado em câmara fria a temperatura ($<-4^{\circ}\text{C}$)¹.

Verificou-se que na determinação de sólidos solúveis ($^{\circ}\text{Brix}$) houve diferença significativa aos 15 e 45 dias de armazenamento. A cultivar Peruano apresentou diminuição significativa em seus valores. A cultivar Caçador apresentou uma tendência a diminuir o conteúdo de sólidos solúveis durante o armazenamento. Essa tendência se assemelha ao estudo conduzido por CARVALHO *et al.* (1991) e podem ser atribuídas a perdas de umidade dos envoltórios externos para os bulbilhos e o ambiente, como acontece em vários frutos no período pós-colheita. As cultivares Peruano e Jinxiang apresentaram variabilidade em seus resultados, indicando variação na sua amostragem.

Em relação ao teor de acidez titulável total (meq/kg) observa-se ter havido aumento com o armazenamento, sendo a cultivar Peruano desde o início das avaliações, enquanto que as cultivares Caçador e Jinxiang começaram a aumentar com 15 dias de armazenamento (Figura 24).

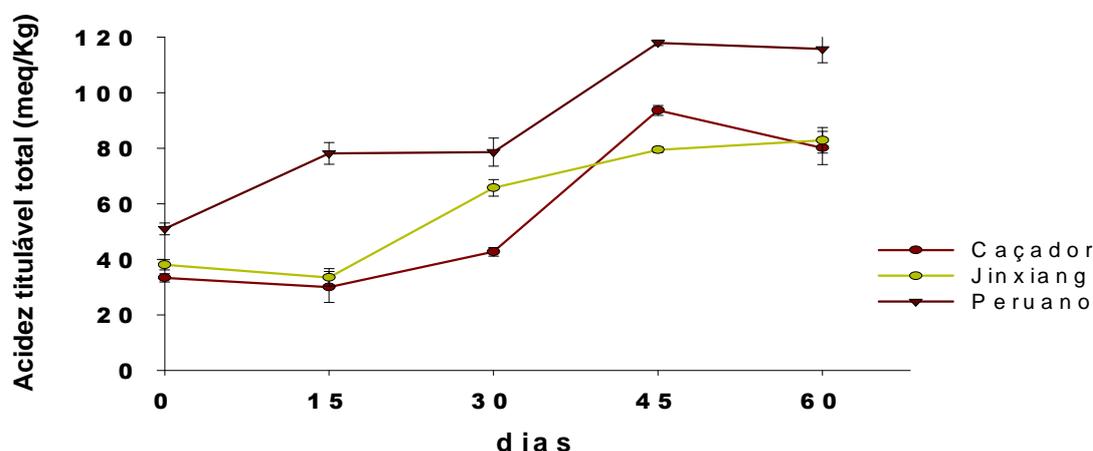


Figura 24 – Variações no conteúdo de acidez total titulável (meq/kg) das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR. Barras verticais representam o desvio padrão da média. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

Os resultados de acidez titulável se assemelham ao estudo conduzido por CARVALHO *et al.* (1991). Quanto mais elevada a acidez, sendo expressa em meq ácido pirúvico, maior é o grau de pungência (sabor e aroma). Dessa forma, a cultivar

¹ (F.V. Resende, comunicação pessoal, 16 de dezembro de 2009).

Peruano apresentou maior conteúdo de acidez e maior pungência durante todo o período de armazenamento em relação as cultivares Caçador e Peruano. Houve diferença significativa entre as cultivares em todos os tempos de avaliação.

Não houve alterações significativas de pH em todas as cultivares ao longo do período de armazenamento (Figura 25).

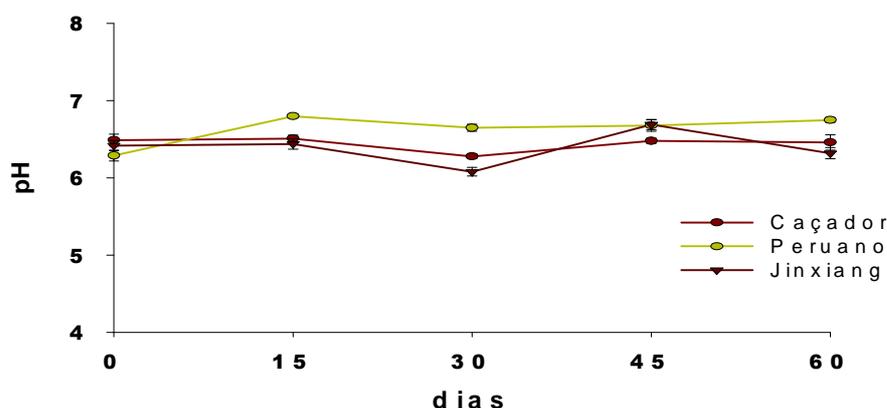


Figura 25 – Variações no conteúdo de pH das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR. Barras verticais representam o desvio padrão da média. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

Verificou-se que na determinação de pH houve diferença significativa nos tempos (15, 30 e 60) dias de armazenamento. Não houve diferença significativa nos tempo 0 e 45 dias entre as cultivares avaliadas.

Sugere-se que as diferenças apresentadas quanto aos teores de umidade, sólidos solúveis, acidez titulável e pH sejam devidos às condições climáticas, solos, variedades e técnicas de manuseio e armazenamento pós-colheita, nas quais influenciam a composição química e, conseqüentemente, a qualidade do alho (OLIVEIRA *et al.*, 2003; RIOS & PENTEADO, 2003).

O teor de alicina da cultivar Caçador, durante os 60 dias de armazenamento refrigerado, manteve-se estatisticamente inalteradas. Por outro lado, as cultivares Jinxiang e Peruano apresentaram redução significativa a partir dos 15 e 45 dias de armazenamento, respectivamente (Figura 26).

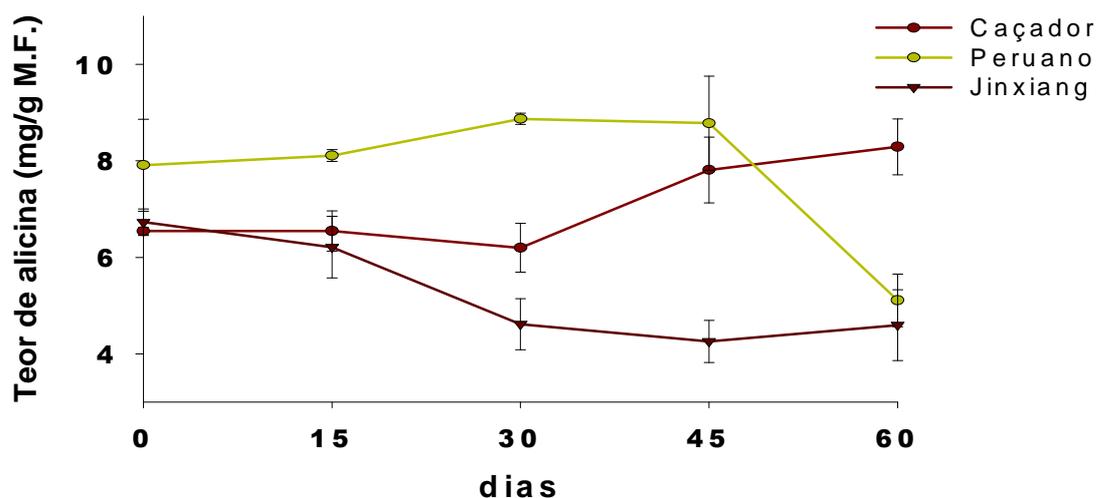


Figura 26 – Variações no teor de alicina (mg/g M.F.) das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR. M.F.= matéria fresca. Barras verticais representam o desvio padrão da média. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

Houve diferença significativa aos 30 dias de avaliação entre as cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang; aos 45 dias entre as cultivares Jinxiang com Caçador e Peruano e aos 60 dias entre as cultivares Caçador com Peruano e Jinxiang. A redução significativa no teor de alicina para a cultivar Jinxiang possivelmente indica ser um produto mais antigo (safra 2007) e que foi armazenado em câmara a temperatura baixa até a data de comercialização. A literatura mostra diferenças nos teores de aliina e alicina durante o armazenamento em diferentes temperaturas como descrito a seguir: EAGLING & STERLING (2000) avaliaram o conteúdo de alicina em 200 amostras de alho coletadas de 43 produtores em diferentes locais da Austrália. O tempo de vida útil dos produtos foi de aproximadamente 30 dias após a colheita. Os resultados apresentaram uma variação entre 0,5 a 9,0 mg/g produto; a maioria das amostras apresentou variação entre 3,0 a 6,0 mg/g do produto. A cultivar Jinxiang apresentou resultado dentro dos valores obtidos por EAGLING & STERLING (2000). Já as cultivares Caçador e Peruano apresentaram período de armazenamento superior ao obtido por EAGLING & STERLING (2000). HUGHES *et al.* (2006) avaliaram os conteúdos de aliina, isoaliina, γ -glutamil alil cisteína sulfóxido (γ -GLUACSO) e γ -glutamil isoalil cisteína sulfóxido (γ -GLUisoACSO) em bulbos de alho da variedade Printanor. Foram avaliados bulbos inteiros de alho estocados por 42 dias a temperatura ambiente e a 4°C . O estudo mostrou diferenças entre as quantidades de isoaliina, γ -GLUACSO e γ -GLUisoACSO. A concentração de isoaliina

aumentou significativamente e as concentrações de γ -GLUACSO e γ -GLUisoACSO diminuíram com a estocagem a temperatura de 4°C. Os níveis de aliina não foram afetados pela temperatura. Por outro lado, CANTWELL *et al.* (2003) identificaram aumento nos teores de aliina, tiosulfonato e piruvato total, quando os bulbos de alho foram estocados a 0-1°C por 4 semanas. É possível que as diferenças obtidas no presente estudo se devam a variedade e as condições de cultivo do produto.

A instabilidade da alicina é observada em solventes de baixa-polaridade. A redução da alicina em análises químicas e biológicas pode ser devida a muitas razões, figurando dentre elas mudanças espontâneas envolvendo a sua forma molecular (FUJISAWA *et al.*, 2008). A capacidade de formação da alicina é diminuída tanto pela destruição mecânica e encolhimento dos compartimentos celulares. A diminuição dos teores deste composto pode ser causada pela destruição parcial ou total dos precursores da alicina, inativação parcial ou total da enzima alliinase e perda dos compostos nutricionais (LAGUNAS & CASTAIGNE, 2008). Portanto, de acordo com o processo de extração utilizado é possível se ter variabilidade nos resultados do conteúdo de alicina.

Na determinação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico todas as cultivares apresentaram redução significativa desde o início do armazenamento. A partir dos 30 dias deixou-se de observar diferenças significativas entre as cultivares. As cultivares Caçador e Jinxiang apresentaram atividade antioxidante superior ao Peruano no início do armazenamento. Até 15 dias de avaliação foi maior na cultivar Caçador (Figura 27).

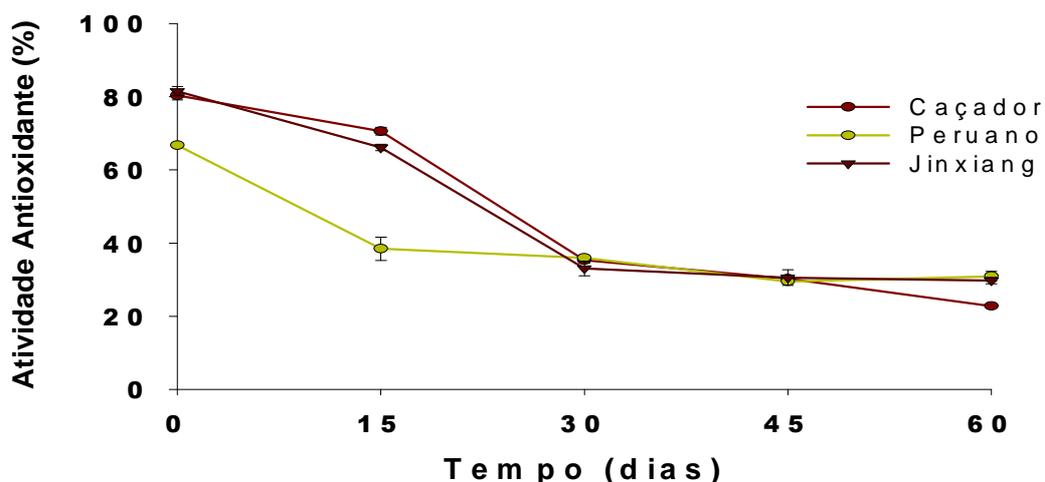


Figura 27 – Variações na atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico (%) das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR. M.F.= matéria fresca. Barras verticais representam o desvio padrão da média. Embrapa Hortaliças, Brasília, DF, 2009.

Similarmente ao realizado no presente estudo, QUEIROZ *et al.* (2009) avaliaram a atividade antioxidante de alho fresco nacional, armazenado a temperatura ambiente, pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico, segundo o método de MILLER (1971). O estudo mostrou que houve aumento da atividade antioxidante durante o período de armazenamento, contrariando ao observado no experimento descrito neste artigo. Os valores determinados no presente ensaio foram maiores do que os identificados por QUEIROZ *et al.* (2009) no início dos estudos e menores no final do experimento, isto é, após 60 dias de avaliação. As diferenças encontradas nos resultados podem ser devido a diversas razões, dentre as quais citam-se: condições climáticas, composição do solo, cultivares analisadas, tipo de solvente empregado (metanol *versus* etanol) e outros.

Na determinação de compostos fenólicos totais (Figura 28), todas as cultivares apresentaram aumento significativo a partir dos 15 dias. A partir de 30 dias o teor de fenólicos foi significativamente maior na cultivar Peruano.

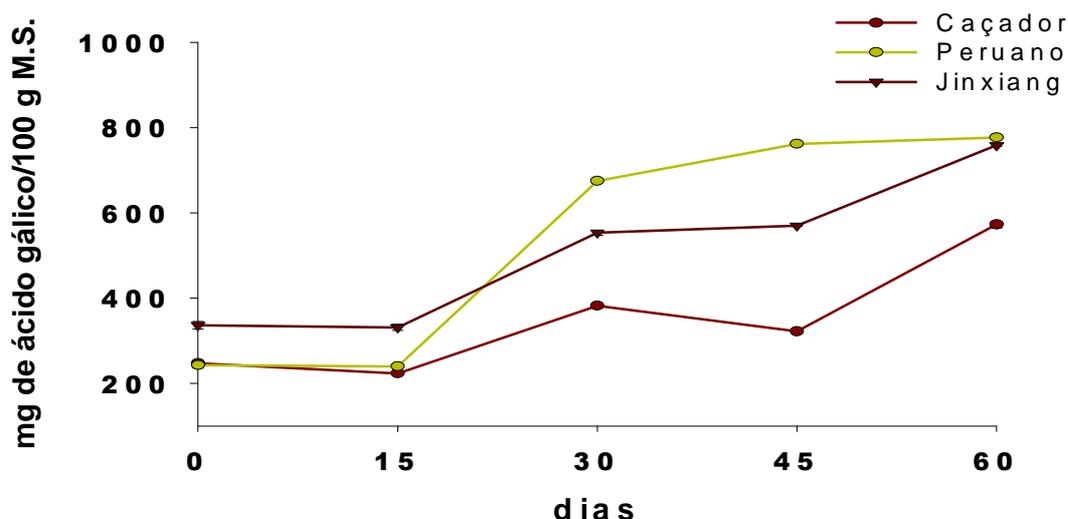


Figura 28 – Variações no conteúdo de compostos fenólicos totais das amostras de alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang durante os 60 dias de armazenamento, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ UR. M.S.= matéria seca.

Verificou-se que na determinação de compostos fenólicos totais houve diferença significativa em todos os tempos de armazenamento. Nos tempos 0 e 15 dias a cultivar Jinxiang foi superior as cultivares Caçador e Peruano; aos 30 e 45 dias todas as cultivares apresentaram diferença e aos 60 dias a cultivar Caçador foi inferior as demais cultivares. QUEIROZ *et al.* (2009) verificaram aumento significativo a partir dos 30 dias de armazenamento, sendo que tal tendência se manteve até o final do estudo. Os teores de compostos fenólicos totais encontrados por aqueles pesquisadores foram superiores aos valores encontrados neste estudo. As diferenças encontradas entre os estudos podem se dever às mesmas razões identificadas acima, quando discutiu-se as discrepâncias observadas para atividade antioxidante, conforme também constataram HOLUB *et al.* (2002). Com relação ao aumento do conteúdo de compostos fenólicos totais nos 60 dias de armazenamento, os resultados deste estudo se assemelham ao de QUEIROZ *et al.* (2009).

2.3.4 Conclusão

As características físico-químicas avaliadas neste estudo mostraram que não houve alteração nos teores de umidade e pH durante os 60 dias de armazenamento refrigerado para as cultivares estudadas. Houve alteração significativa quanto aos teores de acidez titulável para todas cultivares e de sólidos solúveis para a cultivar

Caçador, indicando que essas características se alteram pelo armazenamento e entre diferentes cultivares.

Os dados obtidos quanto ao conteúdo de alicina indicam que a cultivar Caçador apresentou melhor estabilidade, não apresentando diferença significativa durante os 60 dias de armazenamento. A cultivar Peruano manteve-se inalterada por até 45 dias e a cultivar Jinxiang apresentou estável até os 15 dias do estudo.

Na atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico houve redução significativa desde o início do armazenamento para todas as cultivares avaliadas e a partir dos 30 dias deixou-se de observar essas diferenças. As cultivares Caçador e Jinxiang apresentaram atividade antioxidante superior a cultivar Peruano no início do estudo.

No conteúdo de compostos fenólicos totais todas as cultivares apresentaram aumento significativo a partir dos 15 dias de armazenamento. A partir de 30 dias o teor de fenólicos foi significativamente maior na cultivar Peruano.

As características físico-químicas e as propriedades funcionais do alho avaliadas neste estudo mostraram que apresentam alteração durante o armazenamento e que há diferenças significativas entre as cultivares cultivadas e comercializadas no mercado nacional.

2.3.5 Referências Bibliográficas

AMAGASE, H.; PETESCH, B.L.; MATSUURA, H.; KASUGA, S.; ITAKURA, Y. Intake of garlic and its bioactive components. **Journal of Nutrition**, v.131, p.S955-S962, 2001.

AMIM, I.; TAN, S.H. Antioxidant activity of selected seaweeds. **Malaysian Journal of Nutrition**, v.8, n.2, p.167-177, 2002.

BAGHALIAN, K.; ZIAI, S.A.; NAGHAVI, M.R.; BADI, H.N.; KHALIGHI A. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. **Scientia Horticulturae**, v.103, n.2, p.155-166, 2005.

- CANTWELL, M.I.; HONG, G.; KANG, J.; NIE, X. Controlled atmospheres retard sprout growth, affect compositional changes and maintain visual quality attributes of garlic. In: OOSTERHAVEN, J.; PEPPELENBOS, H.W. (Ed.) Proceedings 8th International Controlled Atmosphere Conference. **Acta Horticulture**, v.600, p.791-794, 2003.
- CARVALHO, V.D.; SOUZA, S.M.C.; ABREU, C.M.P.A.; CHAGAS, S.J.R. Tempo de armazenamento e qualidade do alho, cv. Amaranthe. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.26, p.1679-1684, 1991.
- EAGLING, D.; STERLING, S. A cholesterol-lowering extract from garlic. Austrália, **Rural Industries Research and Development Corporation**, 18p, 2000.
- EL-DEMERDASH, F.M.; YOUSEF, M.I.; ABOU EL-NAGA, N.I. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic alloxan-induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.57-63, 2005.
- FUJISAWA, H.; SUMA, K.; ORIGUCHI, K.; KUMAGAI, H.; SEKI, T.; ARIGA, T. Biological and chemical stability of garlic-derived allicin. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.56, n.11, p.4229-4235, 2008.
- HOLUB, B.J.; ARNOTT, K.; DAVIS, J-P; NAGPURKAR, A.; PESCHELL, J. Organosulfur compounds from garlic. In: SHI, J., MAZZA, G., MAGUER, M.L. (Ed.) **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. Whashington: CRC, 2002. p.213-238.
- HUGHES, J.; COLLIN, H.A.; TREGOVA, A.; TOMSETT, A.B.; COSSTICK, R.; JONES, M.G. Effect of low storage temperature on some of the flavour precursors in garlic (*Allium Sativum*). **Plant Foods for Human Nutrition**, v.61, p.81-85, 2006.
- INSTITUT FOR NUTRACEUTICAL ADVANCEMENT. **Allicin Content in Garlic by HPLC (INA Method [110.001](#))**. NSF INTERNATIONAL; **Allicin by high-performance liquid chromatography, INA Method 110.001**, 2005. Disponível em: '<http://www.nsf.org/business/ina/garlic.asp>'. Acesso em: 15 jan. 2008.

- INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz:** métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, v.1, 533p, 1985.
- ISMAIL, A.; MARJAN, Z.M.; FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v.87, p.581-586, 2004.
- KRIS-ETHERTON, P.M.; HECKER, K.D.; BONANOME, A.; COVAL, S.M.; BINKOSKI, A.E.; HILPERT, K.F.; GRIEL, A.E.; ETHERTON, T.D. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. **The American Journal of Medicine**, v.113, n.9B, p.S71-S88, 2002.
- LAGUNAS, L.L.M.; CASTAIGNE, F. Effect of temperature cycling on allinase activity in garlic. **Food Chemistry**, v.111, p.56-60, 2008.
- LAWSON, L.D.; WANG, Z.J. Low allicin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of alliinase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.2592-2599, 2001.
- LI, Y.; XU, S-Y.; SUN, D-W. Preparation of garlic powder with high allicin content by using microwave-vacuum and vacuum drying as well as microencapsulation. **Journal of Food Engineering**, v.83, p.76-83, 2007.
- MILLER, H.E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v.48, p.91, 1971.
- MIRON, T.; BERCOVICI, T.; RABINKOV, A.; WILCHEK, M.; MIRELMAN, D. [H] Allicin: preparation and applications. **Analytical Biochemistry**, v.331, p.364-369, 2004.
- MIRON, T.; SHIN, I.; FEIGENBLAT, G.; WEINER, L.; MIRELMAN, D.; WILCHEK, M.; RABINKOV, A. A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. **Analytical Biochemistry**, v.307, n.1, p.76-83, 2002.
- MORETTI, C.L.; SARGENT, S.A.; HUBER, D.J.; CALBO, A.G.; PUSCHMANN, R. Chemical composition and physical properties of pericarp, locule and placental tissues of tomatoes with internal bruising. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.123, n.4, p.656-660, 1998.

- NUUTILA, A.M.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AARNI, M.; OKSMAN-CALDENTY, K-M. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.82, p.485-493, 2003.
- OLIVEIRA, C.M.; SOUZA, R.J.; MOTA, J.H.; YURI, J.E.; RESENDE, G.M. Determinação do ponto de colheita na produção de alho. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.3, p.506-509, 2003.
- QUEIROZ, Y.S. **Alho (*Allium sativum*) e produtos: atividade antioxidante *in vitro* durante a vida de prateleira**. 2006. 128f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- QUEIROZ, Y.S.; ISHIMOTO, E.Y.; BASTOS, D.H.M.; SAMPAIO, G.R.; TORRES, E.A.F.S. Garlic (*Allium sativum* L.) and ready-to-eat garlic products: *In vitro* antioxidant activity. **Food Chemistry**, v.115, p.371-374, 2009.
- RIOS, M.D.G.; PENTEADO, M.V.C. Determinação de α -tocoferol em alho irradiado utilizando cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). **Química Nova**, v.26, n.1, p.10-12, 2003.
- SANCE, M.M.; BAUZA, M.; CAMARGO, A.B.; GONZALEZ, R.E.; SOTO, V.E. Evaluation of the Argentinean garlic germplasm in relation to its aptitude for the freeze drying process. **Molecular Medicine Chemistry**, v.10, p.33-34, 2006.
- SGARBIERI, V.C.; PACHECO, M.T.B. Revisão: Alimentos funcionais fisiológicos. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.2, p.7-19, 1999.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.
- SOUZA, P.H.M.; SOUZA NETO, M.H.; MAIA, G.A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**, v.37, n.2, p.127-135, 2003.
- TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS – Alho cru, 2008. Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela>>. Acesso em: 09 março 2009.

3. PARTE III – EXPERIMENTOS “IN VIVO”

3.1 CAPÍTULO 4

Efeito do alho em pó sobre o metabolismo lipídico em ratos hiperlipidêmicos

Resumo

Alho possui propriedades benéficas que são atribuídas à presença de compostos organossulfurados. O alvo deste estudo é examinar o efeito hipocolesterolêmico do alho em pó em ratos alimentados com dieta hiperlipídica. Trinta ratos machos Wistar foram divididos em 6 grupos de 5 animais e alimentados durante 15 dias com as seguintes dietas experimentais: dieta controle normolipídica (Controle), dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano (CAP), dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang (CACH), dieta controle hiperlipídica (HPLC), dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano (HPLP) e dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang (HPLCH). A dieta normolipídica constou de dieta basal semipurificada. A dieta hiperlipídica constou da dieta normolipídica adicionada de 0,125% de colato de sódio e 0,5% de colesterol. O extrato aquoso de alho em pó foi dado oralmente nos ratos em base diária (500 mg/kg massa do animal). O teor de alicina foi avaliado, sendo para a cultivar Peruano ($27,04 \pm 0,32$) e para a cultivar Jinxiang ($1,88 \pm 0,26$). A suplementação de alho em pó reduziu o ganho de peso e ingestão diária de ração dos grupos CAP e HPLP. Em condições normolipídicas reduziu significativamente as concentrações de triglicerídeos e lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-colesterol) no plasma em ratos para os grupos CAP e CACH. O grupo CACH apresentou aumento significativo nos níveis de colesterol total (25,49%) e glicose (11,13%) no plasma. Não houve alteração nas concentrações de lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol). Em condições hiperlipídicas (HPLP e HPLCH) não apresentaram alteração nas concentrações plasmáticas de colesterol total, HDL-colesterol, triglicerídeos e VLDL-colesterol. Houve aumento na concentração de glicose no plasma. Os resultados mostram que o alho da cultivar Peruano em condições normolipídicas (CAP) pode reduzir o fator de risco para aterosclerose.

Palavras-chave: Alho em pó, alicina, ratos, colesterol, triglicerídeos.

Effect of garlic powder on lipidic metabolism in hyperlipidemic rats

Abstract

Garlic has beneficial properties that are attributed to the presence of organosulfur compounds. The aim of this study is to examine the hypocholesterolemic effect of garlic powder in rats fed hyperlipidic diet. Thirty male Wistar rats were divided into 6 groups of 5 animals and fed for 15 days with the following diets: normolipidic control diet (Control), normolipidic control diet added garlic powder cultivar Peruano (CAP), normolipidic control diet added garlic powder cultivar Jinxiang (CACH), hyperlipidic control diet (HPLC), hyperlipidic control added garlic powder cultivar Peruano (HPLP) and hyperlipidic control added garlic powder cultivar Jinxiang (HPLCH). The normolipidic diet consisted of semipurified basal diet. The hyperlipidic diet consisted of semipurified basal diet added 0,125% sodium cholate and 0,5% cholesterol. The aqueous extract of garlic powder was given orally to rats on a daily basis (500 mg/kg weight of animal). The allicin content was evaluated, being for the Peruano cultivar (27.04 ± 0.32) and to Jinxiang cultivar (1.88 ± 0.26). Supplementation of garlic powder reduced the weight gain and feed daily intake of groups CAP and HPLP. Under normolipidic diet significantly reduced concentrations of triglycérides and lipoproteins very low density (VLDL) in plasma in rats the groups CAP and CACH. The CACH group showed a significant increase in total cholesterol levels (25,49%) and glucose (11,13%) in plasma. There was no change in concentrations of high density lipoprotein (HDL-cholesterol). Under hyperlipidic diet added garlic powder (HPLP and HPLCH) showed no change in plasma concentrations of total cholesterol, HDL-cholesterol, triglycérides and VLDL-cholesterol. There was an increase in the concentration of glucose in plasma. The results show that garlic cultivar Peruano under normolipidic diet (CAP) may reduce the risk factor for atherosclerosis.

Keywords: powder garlic, allicin, rats, cholesterol, triglycérides.

3.1.1 Introdução

O alho contém 33 compostos organossulfurados (COS), 17 aminoácidos (incluindo todos os aminoácidos essenciais), minerais como fósforo, cálcio, ferro, potássio, magnésio, selênio, zinco e vitaminas (A, B, C e E) (HOLUB *et al.*, 2002). Alho e suas preparações têm sido amplamente reconhecidos como agente para prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, aterosclerose, hiperlipidemia, trombose, hipertensão e diabetes (AGARWALL, 1996). Tem-se sugerido que as propriedades benéficas do alho são atribuídas a compostos organossulfurados específicos, incluindo sulfóxidos e γ -glutamil peptídeos que estão presentes no alho cru (ICHIKAWA, 2006).

Alicina (dialil tiosulfonato) é um líquido volátil, responsável pelo odor pungente do alho e representando aproximadamente 70% de todos tiosulfonatos presentes em dentes de alho esmagados (MIRON *et al.*, 2004). Não é encontrado em plantas intactas, mas é formada pela ação da enzima alliinase (EC4.4.1.4) a partir de um aminoácido não protéico S-alilcisteína sulfóxido (alliina) no momento em que o alho é esmagado (FELDBERG *et al.*, 1988). No alho em pó a conversão de aliina para alicina começa quando a água é adicionada ao pó, então alicina é rapidamente degradada em dissulfeto de dialila (DADS), vinilditiinas e ajoenos (ARNAULT *et al.*, 2005).

A aterosclerose é um dos maiores fatores de risco no desenvolvimento da hipertensão e doenças cardiovasculares (DCV) (ALI *et al.*, 2000). As DCV são as maiores causas de morte entre pessoas ocidentais. O risco de desenvolvimento de DCV é maior para homens do que para mulheres pré-menopausa. Múltiplos fatores contribuem para o seu desenvolvimento, sendo estilo de vida, fumo, inatividade e estresse. Elevados níveis de colesterol no plasma, particularmente lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e triglicerídeos estão associados com um aumento do risco de DCV (TAPIERO *et al.*, 2004). A modificação oxidativa de LDL pela espécie oxidativa reativa (ROS) é também agora considerado um importante mecanismo no desenvolvimento de aterosclerose, uma das patogêneses da hipertensão (RAHMAN & LOWE, 2006). O efeito cardioprotetor do alho tem sido extensivamente avaliado. Vários estudos “in vitro” têm indicado que o alho e seus constituintes inibem a enzima chave envolvendo a síntese de colesterol e ácidos graxos (GEBHARDT, 1993; YEH & YEH, 1994; LIU & YEH, 2001; YEH & LIU, 2001). Em experimentos

animais, extrato de alho mostrou reduzir os níveis de colesterol e lipídeos no plasma de ratos (CHI, 1982; SARAVANAN & PRAKASH, 2004; GORINSTEI *et al.*, 2006). Em humanos, alho reduziu significativamente os níveis de lipídeos no plasma, especialmente colesterol total e LDL-colesterol (BORDIA & VERMA, 1980; QURESHI *et al.*, 1983; QURESHI *et al.*, 1987).

Estabeleceu-se a hipótese que a alicina, um composto bioativo presente no alho poderia atuar de forma benéfica na redução de DCV. Para testar essa hipótese foi utilizado um modelo com ratos e duas cultivares de alho em pó liofilizado, Peruano e Jinxiang para investigar o efeito da alicina na redução das concentrações plasmáticas de triglicerídeos, colesterol total, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e glicose no plasma de animais normo e hiperlipidêmicos.

3.1.2 Material e Métodos

3.1.2.1 Amostra

Bulbos de alhos da cultivar Peruano foram obtidos dos campos experimentais de produção da Embrapa Hortaliças (Brasília, D.F., Brasil) e bulbos da cultivar Jinxiang, importada da China, foram adquiridos da Central de Abastecimento do Distrito Federal S.A. (Brasília, D.F., Brasil). Todos os materiais utilizados eram da safra 2008.

3.1.2.2 Processamento do alho em pó liofilizado

Os materiais foram selecionados, classificados, descascados e embalados em sacos de polietileno. Em seguida, foram congelados a temperatura de $-70 \pm 1^\circ\text{C}$ por aproximadamente 8 horas, utilizando ultra-freezer (ULT1386-5-D40, Revco, Illinois, USA). Posteriormente, foram fatiados em um processador industrial (CL50, Robot Coupe, USA) na espessura de 5 mm e imediatamente liofilizado (LS3000, Terroni, São Carlos, Brasil) por aproximadamente 3 dias. O produto então, foi moído em um moinho de facas (SL31, Solab, Piracicaba, Brasil), colocado em sacos de polietileno, fechado e mantido em um dessecador.

3.1.2.3 Determinação do teor de alicina

O teor de alicina foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo INSTITUTE FOR NUTRACEUTICAL ADVANCEMENT (2005), conforme descrito no item 1.4.2.4.9.

3.1.2.4 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar (n=30), provenientes da Bioagri (Planaltina, Brasil), com aproximadamente 2 meses de idade e pesando entre 160 a 200 g. Durante 15 dias, os animais foram alojados individualmente em caixas de polipropileno, em sala isolada, temperatura $23 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade $55 \pm 1\%$ e fotoperíodo de 12 horas. Todos os animais tiveram livre acesso ao alimento e água. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasil. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos de 5 animais. O grupo 1 recebeu dieta normolipídica (Controle). Os grupos 2 (CAP) e 3 (CACH) receberam a mesma dieta do grupo 1, acrescida do alho em pó liofilizado, sendo a cultivar Peruano para o grupo 2 e a cultivar Jinxiang para o grupo 3. O grupo 4 (HPLC) recebeu uma dieta hiperlipídica, contendo 0,125% de colato de sódio e 0,5% de colesterol (Controle hiperlipídico). Os grupos 5 (HPLP) e 6 (HPLCH) receberam a mesma dieta do grupo 4, acrescida do alho em pó liofilizado, sendo a cultivar Peruano para o grupo 5 e a cultivar Jinxiang para o grupo 6.

3.1.2.5 Dietas

Quatro dietas purificadas foram elaboradas na forma de pellet, em conformidade com as recomendações do *American Institute of Nutrition* para roedores em crescimento (AIN – 93G), sendo: 1) Dieta normolipídica AIN93-G, 2) Dieta normolipídica AIN93-G com alho em pó liofilizado, 3) Dieta hiperlipídica: dieta purificada modificada, acrescida de 0,125% de colesterol e 0,5% de colesterol, conforme o modelo de YANAGITA *et al.* (2003) e 4) Dieta hiperlipídica com alho em pó liofilizado (Tabela 11).

Tabela 11 – Composição das dietas experimentais

Ingredientes (g/kg)	Controle	CAP/CACH	HPLC	HPLP/HPLCH
Amido de milho [†]	529,49	524,49	523,24	518,24
Caseína (≥ 85% de proteína) [†]	200	200	200	200
Sacarose [‡]	100	100	100	100
L-cistina [†]	3	3	3	3
Óleo de soja [§]	70	70	70	70
Celulose microcristalina [†]	50	50	50	50
Mistura mineral – AIN93G [†]	35	35	35	35
Mistura vitamínica – AIN93G [†]	10	10	10	10
Bitartarato de colina [†]	2,5	2,5	2,5	2,5
Tert-butilhidroquinona [£]	0,014	0,014	0,014	0,014
Colesterol [£]	–	–	5	5
Colato de sódio [£]	–	–	1,25	1,25
Alho Liofilizado	–	5	–	5
Total	1000	1000	1000	1000

[†] Rhoster Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande Paulista, SP, Brasil).

[‡] Vetec Química Fina (SP, Brasil).

[§] Refinações de Milho Brasil

[£] Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA).

Para a dieta complementar de alho, foi preparado o extrato aquoso de alho. A quantidade foi equivalente a 500 mg de alho em pó/kg massa do animal e diluída em 1 mL de água filtrada. A dosagem de alho foi baseada em estudos realizados por GORISTEIN *et al.* (2006). Durante o experimento a dose utilizada de alho foi ajustada de acordo com o aumento de massa dos animais experimentais.

3.1.2.6 Procedimento Experimental – Sem esforço físico (SEF)

Os animais antes de iniciar os tratamentos permaneceram em período de adaptação ao ambiente por 5 dias, recebendo dieta comercial (Labina, Purina, Brasil). Após este período, os animais dos diferentes grupos receberam suas respectivas dietas e água *ad libitum*, durante os 15 dias do estudo. O controle do consumo de dieta foi efetuado diariamente e o controle de peso foi realizado a cada dois dias ao longo do tratamento e no final do experimento. Cada animal dos grupos

(CAP, CACH, HPLP e HPLCH) recebeu 1 mL do extrato aquoso de alho, por gavagem.

A amostra de sangue de cada rato individual foi coletada no final do experimento com animais em jejum de 12 horas. Os ratos foram anestesiados pela via intraperitoneal com uma associação de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). A coleta de sangue foi efetuada por pulsão cardíaca. A eutanásia dos animais foi realizada com superdose de barbitúrico. O sangue foi coletado utilizando seringas e agulhas esterilizadas e imediatamente transferido para tubos de hemólise secos com tampa, estocados em reservatório contendo gelo e levados para processamento bioquímico em no máximo 1 hora após a coleta.

3.1.2.7 Análises enzimáticas

O plasma foi separado por centrifugação (centrífuga SIGMA, 2-5, Osterode am Harz, Alemanha) a 366,5 rad/s, por 10 min, em temperatura ambiente e foi feito processamento imediato das amostras. Os ensaios bioquímicos, por meio de sistemas enzimáticos específicos, foram realizados conforme critérios pré-estabelecidos pelo fabricante de cada "kit" para as seguintes dosagens: Triglicerídeos (ABBOTT); Colesterol total (ABBOTT); HDL-colesterol direto, sem precipitação (ABBOTT) e glicose (ABBOTT). A leitura dos teores de cada um dos componentes anteriormente descritos foi realizada em equipamento automatizado ARCHITECH C8000 do Centro de Patologia Clínica, do Hospital Universitário de Brasília (HUB, Brasília, Brasil). A fração de VLDL-colesterol foi calculada pela seguinte equação, de acordo com FRIEDEWALD *et al.* (1972): VLDL-colesterol=(Triglicerídeos/5) utilizadas para valores de triglicerídeos menores que 400 mg/dL.

3.1.2.8 Transformação da dosagem do estudo animal para o humano

A dose animal não deve ser extrapolada para a dose humana equivalente, pela simples conversão baseada no peso corpóreo (REAGAN-SHAW *et al.*, 2007). A *Food and Drug Administration* (FDA) tem sugerido que a extrapolação da dose animal para a dose humana é corretamente executada somente através da normalização pela área da superfície corpórea (ASC), a qual é frequentemente

representada em mg/m² (Tabela 12). A dose humana equivalente pode ser calculada pela seguinte equação:

$$\text{Equação 8: DHE} = \text{Dose animal (mg/kg)} \times \frac{K_m \text{ Animal}}{K_m \text{ Humano}}$$

Sendo:

DHE= Dose humana equivalente;

$K_m \text{ Animal}$ = Fator de conversão, utilizado para converter mg/kg dose utilizado no estudo para a dose em mg/m² do animal experimental;

$K_m \text{ Humano}$ = Fator de conversão, utilizado para converter mg/kg dose utilizado no estudo para a dose em mg/m² da espécie humana.

Tabela 12 – Conversão da dose animal para DHE baseado em ASC.

Espécies	Peso (kg)	ASC (m ²)	Fator K_m
Humano			
Adulto	60	1,6	37
Criança	20	0,8	25
Babuíno	12	0,6	20
Cachorro	10	0,5	20
Macaco	3	0,24	12
Coelho	1,8	0,15	8
Porquinho-da-Índia	0,4	0,05	8
Rato	0,15	0,025	6
Hamster	0,08	0,02	5
Camundongo	0,02	0,007	3

Valores baseados nos dados da FDA Draft Guidelines. Para converter a dose em mg/kg para dose em mg/m², multiplicar pelo fator K_m .

3.1.2.9 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos, com 5 repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e todas as diferenças foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5% ($p < 0,05$). Os valores de cada resultado foram expressos pela média \pm desvio padrão.

3.1.3 Resultados e Discussão

3.1.3.1 Teor de alicina

O teor de alicina (mg/g do produto em matéria seca) no extrato aquoso de alho liofilizado foram os seguintes: cultivar Peruano ($27,04 \pm 0,32$) e cultivar Jinxiang ($1,88 \pm 0,26$). A diferença nos resultados se deve a instabilidade da alicina que pode variar durante o processamento (FREEMAN & KODERA, 1995). Segundo LAWSON & HUGHES (1992) o valor encontrado de alicina em alho em pó correspondeu a 7,52 mg/g pó, sendo o processamento obtido por secagem a 60°C até peso constante de fatias de alho, com 3 mm de espessura. O tempo de secagem correspondeu a aproximadamente 57 horas e foi seguida de pulverização utilizando um moinho. O extrato de alho em pó foi obtido da adição de água (20 mL/g) e incubado a 23°C por 5 min. No mesmo estudo, os autores avaliaram os efeitos da secagem do alho na produção de tiosulfonatos. A quantidade de alicina formada no produto fresco correspondeu a 12,1 mg/g produto em matéria seca e no alho em pó foi de 1,6 mg/g pó. A perda obtida pela secagem foi de 4%. Neste estudo foram obtidos valores para o alho em pó em relação ao estudo conduzido por LAWSON & HUGHES. Segundo HOLUB (2002), problemas aumentam quando diferentes métodos de secagem são utilizados. A homogeneização do alho por *spray-drier* resulta na perda da enzima alliinase, o mesmo ocorrendo com métodos de secagem em temperaturas muito altas. Secagem em forno a temperaturas baixas (<60°C) tem pouco efeito na produção dos principais tiosulfonatos (alicina e alil metil tiosulfonato). Em outro estudo LAWSON *et al.* (1991a) avaliaram a composição dos principais tiosulfonatos, entre eles a alicina presentes em tabletes de alho em pó comercializados no mercado da Austrália, Alemanha, Estados Unidos e Japão. Os valores encontrados corresponderam a 3,60 mg/g produto (Austrália); 3,10 mg/g produto (Estados Unidos); 0,26 a 2,55 mg/g produto (Alemanha) e não detectado (Japão). Segundo os autores, essa ampla variação foi devida a procedimentos diferentes de processamento utilizado no preparo do alho em pó.

O alho em pó tem o potencial de preservar a capacidade de liberação da alicina do alho, entretanto enquanto alguns alhos em pó liberam grande quantidade de alicina em contato com a água, muitos não indicam variação nos métodos de

produção de alho em pó (LAWSON *et al.*, 1991a). Desta forma, podemos considerar possíveis variações nos resultados.

3.1.3.2 Efeito do alho em pó no peso corpóreo

A suplementação de alho em pó liofilizado nas dietas normolipídica e hiperlipídica influenciou no peso corpóreo dos animais experimentais. Ratos alimentados com alho em pó liofilizado da cultivar Peruano (CAP e HPLP) apresentaram menor peso corpóreo, ganho de peso após os 15 dias do estudo e consumiram menor quantidade de ração em relação aos demais grupos. A dieta hiperlipídica não apresentou diferença significativa no peso corpóreo, ganho de peso e consumo da ração em relação à dieta normolipídica (Tabela 13).

Tabela 13 – Efeito do alho em pó liofilizado nas dietas normolipídicas e hiperlipídicas em relação ao peso corpóreo, ganho de peso e consumo da ração nos grupos de ratos¹

Grupo de estudo*	Peso corpóreo (g) 1° dia*	Peso corpóreo (g) 15° dia*	Ganho de peso (%)	Consumo da ração (g/dia)
1 Controle	184,17 ± 12,36 a	267,43 ± 18,30 a	54,34 a	32,25 ± 2,66 a
2 CAP	172,17 ± 12,09 a	222,56 ± 7,57 b	29,58 b	26,65 ± 1,56 b
3 CACH	179,05 ± 8,61 a	264,14 ± 15,09 a	47,93 a	30,98 ± 3,72 a
4 HPLC	177,66 ± 3,17 a	267,41 ± 5,13 a	50,53 a	33,22 ± 2,15 a
5 HPLP	165,88 ± 11,39 a	218,46 ± 6,19 b	32,24 b	24,32 ± 0,51 b
6 HPLCH	173,34 ± 8,06 a	284,84 ± 10,34 a	64,42 a	32,16 ± 1,31 a

*Controle: dieta controle normolipídica; CAP: dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano; CACH: dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang; HPLC: dieta controle hiperlipídica; HPLP: dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano e HPLCH: dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang.

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão (dp), n=5.

ab Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na coluna, indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

O resultado referente ao grupo HPLP assemelha-se ao estudo conduzido por CHI *et al* (1982), na qual ratos alimentados com 1% de colesterol e 15% de gordura de porco e suplementado com 2% e 4% de alho em pó liofilizado durante 4 semanas, apresentaram diminuição significativa na ingestão de ração e ganho de peso no grupo com dieta de colesterol suplementada com 2% de alho. Outros estudos suplementados com alho em pó não mostraram alteração na ingestão de ração e ganho de peso (ALI *et al.*, 2000; AOUDI *et al.*, 2000).

Os resultados mostram que o alho da cultivar Peruano pode ajudar na perda de peso, diminuindo o apetite. O possível mecanismo da redução do apetite se deve ao forte odor do alho, que estimula o centro de saciedade no cérebro, à leptina e desse modo reduz à vontade de comer. Ou o alho pode estimular o sistema nervoso a liberar hormônios como a adrenalina e esses hormônios podem acelerar a taxa metabólica ajudando na perda de peso (MEDSPICE, 2009).

Como o alho Peruano possui maior quantidade de alicina, conseqüentemente possui um maior odor pungente, gerando um estímulo maior no cérebro ou acelerando a taxa metabólica.

3.1.3.3 Concentrações plasmáticas

Verificamos na Tabela 14 os resultados referentes as concentrações plasmáticas dos grupos experimentais.

Tabela 14 – Concentrações plasmáticas de colesterol total, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e triglicerídeos dos animais alimentados com dietas normolipídicas e hiperlipídicas¹

Lipídeos plasmáticos (mmol/L)				
Grupo de estudo*	Colesterol Total	HDL-Colesterol	VLDL-Colesterol	Triglicerídeos
1 Controle	1,459 ± 0,01 c	0,639 ± 0,01 ba	0,647 ± 0,02 a	3,235 ± 0,19 a
2 CAP	1,534 ± 0,09 c	0,656 ± 0,03 ba	0,421 ± 0,03 b	2,105 ± 0,13 b
3 CACH	1,831 ± 0,10 b	0,682 ± 0,06 a	0,398 ± 0,03 b	1,992 ± 0,17 b
4 HPLC	2,296 ± 0,12 a	0,561 ± 0,06 b	0,376 ± 0,02 b	1,879 ± 0,11 b
5 HPLP	2,409 ± 0,05 a	0,647 ± 0,04 ba	0,372 ± 0,003 b	1,860 ± 0,02 b
6 HPLCH	2,322 ± 0,03 a	0,622 ± 0,02 ba	0,372 ± 0,02 b	1,860 ± 0,08 b

*Controle: dieta controle normolipídica; CAP: dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano; CACH: dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang; HPLC: dieta controle hiperlipídica; HPLP: dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano e HPLCH: dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang.

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão (dp), n=5.

ab Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na coluna, indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

3.1.3.4 Efeito do alho em pó nos níveis de colesterol total

O grupo CAP manteve os níveis de colesterol semelhante ao grupo Controle, enquanto o grupo CACH houve um aumento significativo (25,49%) nestes níveis. Ratos alimentados com dieta hiperlipídica apresentaram aumento significativo nos níveis de colesterol no plasma quando comparado ao grupo alimentado com dieta normolipídica. Os grupos com dieta hiperlipídica suplementados com alho (HPLP e HPLCH) não apresentaram diferença significativa em relação ao controle com dieta hiperlipídica (HPLC) (Tabela 14).

Os resultados deste estudo diferem dos estudos conduzidos por AOUDI *et al.* (2000), nos quais verificaram que a suplementação de 10% de alho fresco (equivalente a 2-3% de alho em pó) na dieta causou uma redução significativa nos níveis de colesterol no plasma (12,2%), suficiente para ter um efeito hipocolesterolêmico e GORISTEIN *et al.* (2006) em que ratos alimentados com dieta com alto conteúdo de colesterol (1%) e suplementada com alho em pó liofilizado (500 mg/kg peso corpóreo do animal) durante 4 semanas apresentaram redução significativa nos níveis de colesterol no plasma quando comparado ao seu grupo controle.

3.1.3.5 Efeito do alho em pó nos níveis de HDL-colesterol

Os níveis de HDL-colesterol não mostraram variação estatística significativa entre as dietas normolipídicas e hiperlipídicas, porém ocorreu um aumento em seus níveis quando as dietas foram suplementadas com alho, não sendo significativo (Tabela 14).

Estes resultados se assemelham aos estudos conduzidos por (CHANG & JOHNSON 1980; CHI *et al.*, 1982; RAJASREE *et al.*, 1996), nos quais a administração de alho e proteína do alho (1 a 4%) em ratos hipercolesterolêmicos induzidos pela dieta rica em colesterol, não apresentou diferença significativa nos níveis de HDL-colesterol.

3.1.3.6 Efeito do alho em pó nos níveis de VLDL-colesterol e Triglicerídeos

Houve diminuição significativa nas concentrações de VLDL-colesterol e triglicerídeos no soro de ratos dos grupos (CAP, CACH, HPLC, HPLP e HPLCH) em relação ao Controle. A redução para os grupos de estudo em ambas as concentrações, foram: 34,9% para o CAP, 38,4% para CACH, 41,9% para HPLC e de 42,5% para HPLP e HPLCH. Porém, entre as dietas hiperlipídicas, não houve diferença significativa nos níveis de VLDL-colesterol e triglicerídeos (Tabela 14).

O presente estudo demonstrou que a dieta suplementada com alho em condições normolipídicas reduziu significativamente as concentrações de triglicerídeos e VLDL-colesterol no plasma em ratos. Esses resultados se assemelham ao estudo conduzido por YANAGITA *et al.* (2003), na qual avaliaram o efeito da cicloalliina, um ácido imino contendo enxofre presente na cebola, no metabolismo lipídico em ratos, sendo suplementados aos níveis de 0,1% e 0,3% de cicloalliina na dieta hiperlipídica (contendo 0,5% de colesterol e 0,125% de colato de sódio). Houve redução significativa nos níveis de triglicerídeos quando comparado ao controle em ambos os níveis de cicloalliina.

Elevados níveis de triglicerídeos no soro estão associados com condições patogênicas que aceleram a aterosclerose, além de existirem evidências de que a hipertrigliceridemia é um fator de risco independente para doenças coronarianas, pois contribui para as cardiopatias devido a efeito aterogênico direto das lipoproteínas ricas em triglicerídeos (SCHIAVO *et al.*, 2003). Portanto, o consumo de alho dos grupos CAP e CACH podem reduzir o risco de doenças cardíacas devido à redução dos níveis de triglicerídeos e VLDL-colesterol.

3.1.3.7 Efeito do alho em pó nos níveis de glicose

Os níveis de glicose no plasma foram alterados pelo tratamento das dietas. Houve aumento significativo nos grupos de estudo CACH, HPLP e HPLCH quando comparado ao Controle. Não houve diferença significativa no grupo CAP em relação ao Controle. Houve redução significativa no grupo HPLC quando comparado ao Controle (Tabela 15).

Tabela 15 – Efeito do alho em pó liofilizado nas dietas normolipídicas e hiperlipídicas em relação à concentração de glicose no plasma em ratos

Grupo de estudo*	Concentração de glicose (mmol/L)
1 Controle	10,749 ± 0,05 b
2 CAP	10,230 ± 1,03 b
3 CACH	11,998 ± 0,13 a
4 HPLC	8,297 ± 0,61 c
5 HPLP	13,227 ± 0,61 a
6 HPLCH	13,708 ± 1,14 a

*Controle: dieta controle normolipídica; CAP: dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano; CACH: dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang; HPLC: dieta controle hiperlipídica; HPLP: dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano e HPLCH: dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang.

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão (dp), n=5.

ab Médias seguidas por letras minúsculas diferentes, na coluna, indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Portanto, em condições normolipídicas o consumo de alho CACH pode elevar os níveis de glicose no sangue, assim como os grupos (HPLP e HPLCH) em condições hiperlipídicas.

O efeito do alho nas concentrações de glicose tem sido pouco estudado, e os estudos já conduzidos tem sido inconsistentes. CHI *et al.* (1982) não encontraram diferença significativa em ratos alimentados com 1% de colesterol e 15% de gordura de porco e suplementado com 2% e 4% de alho em pó liofilizado durante 4 semanas. ALI *et al.* (2000), utilizaram alho em pó contendo 0,6% de alicina em ratos alimentados com 2% de colesterol por 6 semanas e não houve diferença significativa entre os tratamentos. AOUDI *et al.* (2000), utilizaram 10% de alho fresco por 12 semanas, em ratos alimentados com 2% de colesterol, os resultados mostraram redução significativa entre as dietas normolipídica controle e hiperlipídica controle, que se assemelha a este estudo. Os autores sugerem que há um efeito do colesterol sobre a glicose no plasma, ou um efeito global, na qual o mecanismo é desconhecido.

As diferenças apresentadas neste estudo em relação aos dados de literatura quanto aos níveis de colesterol total, HDL-colesterol, VLDL-colesterol, triglicerídeos e glicose no plasma, podem ser devidas as concentrações de alho utilizada, forma de preparo do alho e duração do experimento.

3.1.3.8 Transformação da dosagem do estudo animal para o humano

A dose diária de alho em pó liofilizada utilizada neste estudo foi de 500 mg/kg de peso do animal, considerando o fator de conversão para rato de 6 e para humano (adulto) de 37, o cálculo da DHE para o alho em pó liofilizado foi de 81,08 mg/kg, na qual equivale a dose de 4864,86 mg ou 4,86 g para uma pessoa de 60 kg. Considerando 500 mg de alho em pó liofilizado equivalente a 1400 mg de alho fresco, o valor de DHE passa a ser de 227,03 mg/kg, na qual equivale a dose de 13621,62 mg ou 13,62 g de alho fresco para uma pessoa de 60 kg.

Baseado em numerosos ensaios clínicos em humanos, a ingestão de alho cru até 10 g/dia (1 a 2 dentes de alho), ou 4-6 g de alho em pó/dia, é considerada segura quando feita em uma refeição (KOCH, 1996). Portanto, a ingestão de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano na dose de ~5 g/dia para uma pessoa de 60 kg ou o consumo de 10 g/dia de alho fresco (2 dentes de alho), conforme dados de literatura já que os valores obtidos neste estudo estão acima do especificado, podem contribuir na redução de triglicerídeos e VLDL-colesterol em indivíduos normolipidêmicos.

3.1.4 Conclusão

O presente estudo utilizando um modelo com ratos mostrou que o extrato aquoso de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano reduziu os níveis de triglicerídeos e VLDL-colesterol no plasma em condições normolipídicas. A cultivar Jinxiang apesar de reduzir os níveis de triglicerídeos e VLDL-colesterol, aumentou significativamente os níveis de colesterol total em condições normolipídicas e os níveis de glicose em condições normo e hiperlipídicas, não sendo recomendado sua utilização como efeito protetor a saúde. As diferenças entre as cultivares avaliadas sugerem que o teor de alicina influenciou nos resultados "in vivo".

Embora não seja o objetivo deste estudo verificou-se que houve redução significativa no ganho de peso e ingestão diária de ração no grupo suplementado com alho Peruano em condições normo e hiperlipídicas.

Estudos adicionais precisam ser realizados visando o entendimento do papel da alicina do ponto de vista bioquímico.

3.1.5 Referências Bibliográficas

- AGARWAL, K.C. Therapeutic actions of garlic constituents. **Medicinal Research Reviews**, v.16, n.1, p.111-124, 1996.
- ALI, M.; AL-QATTAN, M.K.; AL-ENEZI, F.; KHANAFER, R.M.A; MUSTAFA, T. Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.62, n.4, p.253-259, 2000.
- ALI, M.; AL-QATTAN, M.K.; AL-ENEZI, F.; KHANAFER, R.M.A; MUSTAFA, T. Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.62, n.4, p.253-259, 2000.
- AOUADI, R.; AOUIDET, A.; ELKADHI, A.; RAYANA, B.; JAAFOURA, H.; TRITAR, B.; NAGATI, K. Effect of fresh garlic (*Allium Sativum*) on lipid metabolism in male rats. **Nutrition Research**, v.20, n.2, p.273-280, 2000.
- ARNAULT, I.; HAFFNER, T.; SIESS, M.H.; VOLLMAR, A.; KAHANE, R.; AUGER, J. Analytical method for appreciation of garlic therapeutic potential and for validation of a new formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, p.963-970, 2005.
- BORDIA, A; VERMA, S.K. Effect of garlic feeding on regression of experimental atherosclerosis in rabbits. **Artery**, v.7, p.428-437, 1980.
- CHANG, M.L.W.; JOHSON, M.A. Effect of garlic on carbohydrate metabolism and lipid synthesis in rats. **Journal of Nutrition**, v.110, p.931-936, 1980.
- CHI, M.S.; KOH, E.T.; TROY, J.S. Effects of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol or lard. **Journal of Nutrition**, v.112, p.241-248, 1982.
- CHI, M.S.; KOH, E.T.; TROY, J.S. Effects of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol or lard. **Journal of Nutrition**, v.112, p.241-248, 1982.
- FELDBERG, R.S.; CHANG, S.C.; KOTIK, A.N.; NADLER, M.; NEUWIRTH, Z.; SUNDSTROM, D.C.; THOMPSON, N.H. In vitro mechanism of inhibition of bacterial cell growth by allicin. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.32, p.1763-1768, 1988.

- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Center for drug evaluation and research, Center for Biologics. Rockville, Maryland, USA. 2002.
- FREEMAN, F., KODERA, Y. Garlic chemistry: stability of S-(2-propenyl)-2-propene-1-sulfinothionate (allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.2332-2338, 1995.
- GEBHARDT, R. Multiple inhibitory effects of garlic extracts on cholesterol biosynthesis in hepatocytes. **Lipids**, v.28, p.613-619, 1993.
- GORISTEIN, S.; LEONTOWICZ, M.; LEONTOWICZ, H.; JASTRZEBSKI, Z.; DRZEWIECKI, J.; NAMIESNIK, J.; ZACHWIEJA, Z.; BARTON, H.; TASHMA, Z.; KATRICH, E.; TRAKHTENBERG, S. Dose-dependent influence of commercial garlic (*Allium sativum*) on rats fed cholesterol-containing diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4022-4027, 2006.
- HOLUB, B.J.; ARNOTT, K.; DAVIS, J-P; NAGPURKAR, A.; PESCHELL, J. Organosulfur compounds from garlic. In: **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. Washington, 2002. cap.2, p.213-279.
- ICHIKAWA, M.; NAGATOSHI, I.; KAZUHISA, O. Changes in Organosulfur Compounds in Garlic Cloves during Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4849-4854, 2006.
- INSTITUTE FOR NUTRACEUTICAL ADVANCEMENT. Allicin Content in Garlic by HPLC (INA Method [110.001](#)). NSF INTERNATIONAL; Allicin by high-performance liquid chromatography, INA Method 110.001, 2005. Disponível em: <http://www.nsf.org/business/ina/garlic.asp>. Acesso em: 15 jan. 2008.
- LAWSON, L.D.; HUGHES, B.G. Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic. **Planta Medica**, v.58, p.345-350, 1992.
- LAWSON, L.D.; WANG, Z-Y.J.; HUGHES, B.G. γ -Glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other *Allium* spp: Precursors of age-dependent trans-1-propenyl thiosulfinates. **Journal of Natural Products**, v.54, p.436-444, 1991.

- LIU, L.; YEH, Y.Y. Water-soluble organosulfur compounds of garlic inhibit fatty acid and triglyceride synthesis in cultured rat hepatocytes. **Lipids**, v.36, p.395-400, 2001.
- MEDSPICE HEALTH PRODUCTS. Appetite, weight loss: how spices help control obesity. Disponível em: <http://www.medspice.com/content/view/89/69> . Acesso em:12 out. 2009.
- MIRON, T.; BERCOVICI, T.; RABINKOV, A.; WILCHEK, M.; MIRELMAN, D. [H] Allicin: preparation and applications. **Analytical Biochemistry**, v.331, 364-369, 2004.
- QURESHI, A.A.; ABUIRMEILEH, N.; DIN, Z.Z.; ELSON, C.E.; BURGER, W.C. Inhibition of cholesterol and fatty acid biosynthesis in liver enzymes and chicken hepatocytes by polar fractions of garlic. **Lipids**, v.18, p.343-348, 1983.
- QURESHI, A.A.; CRESNSHAW, T.D.; ABUIRMEILEH, N.; PETERSON, D.M.; ELSON, C.E. Influence of minor plant constituents on porcine hepatic lipid metabolism: impact on serum lipid. **Atherosclerosis**, v.64, p.109-115, 1987.
- RAHMAN, K.; LOWE, G.M. Garlic and cardiovascular disease: a critical review. **Journal of Nutrition**, v.136, p.736S-740S, 2006.
- RAJASREE, C.R.; RAJMOHAN, T.; AUGUSTI, K.T. Hypolipidemic effect of garlic protein substituted for casein diet of rats compared to those of garlic oil. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.34, p.337-340, 1996.
- REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v.22, p.659-661, 2007.
- SARAVANAN, G; PRAKASH, J. Effect of garlic (*Allium sativum*) on lipid peroxidation in experimental myocardial infarction in rats. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, p.155-158, 2004.
- SCHIAVO, M.; LUNARDELLI, A.; OLIVEIRA, J.R. Influência da dieta na concentração sérica de triglicérides. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.39, n.4, p.283-288, 2003.
- TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. Organosulfur compounds from alliaceae in the prevention of human pathologies. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v.58, p.183-193, 2004.

- YANAGITA, T.; HAN, S-Y; WANG, Y-M; TSURUTA, Y.; ANNO, T. Cycloalliin, a cyclic sulfur imino acid, reduces serum triacylglycerol in rats. **Nutrition**, v.19, n.2, p.140-143, 2003.
- YANAGITA, T.; HAN, S-Y; WANG, Y-M; TSURUTA, Y.; ANNO, T. Cycloalliin, a cyclic sulfur imino acid, reduces serum triacylglycerol in rats. **Nutrition**, v.19, n.2, p.140-143, 2003.
- YEH, Y.Y.; LIU, L. Cholesterol-lowering effects of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. **Journal of Nutrition**, v.131, p. 989S-993S, 2001.
- YEH, Y.Y.; YEH, S.M. Garlic reduces plasma lipids by inhibiting hepatic cholesterol and triacylglycerol synthesis. **Lipids**, v.29, p.189-193, 1994.

3.2 CAPÍTULO 5

Estudo em ratos do efeito do alho em pó no infarto agudo do miocárdio

Resumo

O alho e suas preparações têm sido amplamente reconhecidos como agentes de prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares. O objetivo deste estudo foi avaliar o efeito do alho em pó no infarto agudo do miocárdio (IAM) em ratos alimentados com dieta normo e hiperlipídica. O estudo foi realizado em duas etapas, sendo uma com esforço físico - CEF (para avaliar o efeito do alho no IAM) e outra sem esforço físico - SEF (controle para o IAM). Trinta ratos machos Wistar foram divididos em 6 grupos de 5 animais e alimentados durante 15 dias. Os grupos Controle (controle normolipídico); CAP (cultivar Peruano) e CACH (cultivar Jinxiang) receberam a mesma dieta Controle acrescida do extrato de alho em pó liofilizado; HPLC (controle hiperlipídico); HPLP(cultivar Peruano) e HPLCH(cultivar Jinxiang) receberam a mesma dieta do grupo HPLC, acrescida do extrato de alho em pó liofilizado. No 16º dia os animais passaram por atividade física exaustiva de natação (CEF) por 50 min, em piscina redonda com água à temperatura ambiente. Foram analisadas o potencial de alicina e as dosagens bioquímicas creatinoquinase (CK), creatinoquinase fração MB (CK-MB), lactato desidrogenase (LDH), transaminase glutâmico oxalacética (TGO) e transaminase glutâmico pirúvica (TGP). O teor de alicina foi avaliado, sendo para a cultivar Peruano ($27,04 \pm 0,32$) e para a cultivar Jinxiang ($1,88 \pm 0,26$). A suplementação de extrato de alho em pó reduziu o ganho de peso e ingestão diária de ração dos grupos CAP e HPLP. No experimento CEF, em condições normolipídicas, observou-se fator de risco ao IAM, sendo no grupo CAP devido às dosagens de CK e CK-MB elevadas e no grupo CACH pelas dosagens de CK, CK-MB, TGO e TGP elevadas. Em condições hiperlipídicas e CEF, o grupo HPLP não apresentou alteração nos marcadores referentes ao IAM (CK, CK-MB, LDH, TGO e TGP), demonstrando atuação protetora ao risco cardiovascular da cultivar Peruano. Para o grupo HPLCH não houve alteração nos marcadores CK, CK-MB, TGO e TGP referentes ao IAM, porém houve aumento significativo nas dosagens de LDH, sugerindo eventuais outros efeitos danosos. No experimento SEF em condições normolipídicas o grupo CAP não apresentou alterações significativas nas dosagens bioquímicas referentes ao IAM e o grupo CACH apresentou redução

nas dosagens de CK e CK-MB e aumento na concentração de TGP indicando comprometimento hepatocelular. Em condições hiperlipídicas e SEF, o grupo HPLP apresentou redução significativa nas dosagens bioquímicas referentes ao IAM (CK, CK-MB, LHD e TGP) e para o grupo HPLCH observou-se redução significativa nas dosagens (CK e CK-MB), não sendo observadas alterações nas dosagens de LDH, TGO e TGP. Os resultados mostram que o alho da cultivar Peruano pode contribuir na redução de peso e em condições hiperlipídicas pode reduzir o risco ao IAM.

Palavras-chave: Alho em pó, infarto, ratos, doenças cardiovasculares.

Rat study the effect of garlic powder in acute myocardial infarction

Abstract

Garlic and its preparations have been widely recognized as agents of prevention and treatment of cardiovascular diseases. The aim of this study was to evaluate the effect of garlic powder in acute myocardial infarction (AMI) in rats fed normal diets and meal. The study was conducted in two stages, one with physical exertion - CEF (to available the effect of garlic in AMI) and one without physical effort - SEF (control for AMI). Thirty male Wistar rats were divided into 6 groups of 5 animals and fed for 15 days. Control (normolipidic control) and CAP (cultivar Peruano) and CACH (cultivar Jinxiang) received the same diet added control extract of garlic powder freeze-dried, HPLC (hyperlipidic control); HPLP (cultivar Peruano) and HPLCH (cultivar Jinxiang) received the same diet group HPLC added the extract of garlic powder. The 16th day the animals were submitted to exhaustive exercise swimming (CEF) for 50 min in round pool with water at room temperature. We analyzed the potential of allicin and biochemical dosage, kinase (CK), creatine kinase MB fraction (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), glutamic oxaloacetic transaminase (GOT) and glutamic pyruvic transaminase (GPT). The allicin content was evaluated, being for the Peruano cultivar (27.04 ± 0.32) and to Jinxiang cultivar (1.88 ± 0.26). Supplementation of garlic extract powder reduced the weight gain and feed intake of groups and CAP and HPLP. In the experiment CEF and under normilipidic condition, there was a risk factor for AMI in the CAP group due elevated dosage to the CK and CK-MB and the group CACH by the CK, CK-MB, AST and ALT elevated dosages. Under hyperlipidemic condition and CEF, the group HPLP no change in markers related to

AMI (CK, CK-MB, LDH, AST and ALT), demonstrating the protective role of cardiovascular risk for cultivar Peruano. For the group HPLCH no change in markers CK, CK-MB, AST and ALT for the IAM, but significant increase in serum LDH, suggesting other possible harmful effects. In the experiment SEF and under normolipidic condition, CAP group showed no significant changes in biochemical measurements for the AMI and CACH group showed a reduction in the CK and CK-MB and increased concentration of TGP indicating hepatocellular involvement. Under hyperlipidemic condition and SEF, the group HPLP had a significant reduction in the biochemical measurements related to AMI (CK, CK-MB, LHD and GPT) and the group HPLCH observed significant reduction in the dosage (CK and CK-MB), not being observed changes in serum LDH, AST and ALT. The results show that the Peruano cultivar of garlic can help in reducing weight and hyperlipidemic conditions may reduce the risk of AMI.

Keywords: Garlic powder, infarction, rats, cardiovascular disease.

3.2.1 Introdução

O IAM é a principal causa de mortalidade e morbidade em todo o mundo, sendo o responsável pela maioria das mortes atribuídas às cardiopatias isquêmicas, tendo como principais fatores de risco o alcoolismo, tabagismo, a hipertensão, *diabetes mellitus* e a hipercolesterolemia, que também são os principais fatores da aterogênese (LORGERIL *et al.*, 2002; LUCAS *et al.*, 2005; MUKAMAL *et al.* 2005).

O IAM é uma síndrome clínica resultante do fluxo arterial coronariano deficiente para uma área do miocárdio, ocasionando morte celular e necrose. É ocasionado por uma placa vulnerável (rica em lipídeos) que, ao se romper, promove ativação plaquetária e formação de um trombo que pode ocluir totalmente a artéria coronariana (IAM do tipo supra de ST) ou levar à suboclusão vascular (IAM não supra de ST), podendo ocasionar dor torácica ou morte súbita (KANAAN & HORSTMANN, 2006).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o diagnóstico do IAM é baseado na presença de dois dos três dos critérios a seguir: dor torácica, alteração no eletrocardiograma e anormalidade dos marcadores protéicos e enzimáticos, sendo estes de grande valor, tanto no diagnóstico agudo e crônico como no diagnóstico diferencial e no prognóstico do controle da evolução da doença no IAM.

Os marcadores bioquímicos cardíacos são utilizados para diagnóstico em pacientes com suspeita de terem desenvolvido o IAM (KANAAN & HORSTMANN, 2006).

Vários marcadores específicos surgiram nos últimos anos com esta finalidade. Após a lesão cardíaca, substâncias intracelulares passam para a circulação e suas concentrações no sangue dependem do tempo, da extensão, gravidade e caráter agudo das lesões celulares. A atividade enzimática e a concentração das proteínas na corrente sangüínea refletem normalmente um quadro atual. A velocidade (tempo) de aparecimento e de eliminação de cada um dos marcadores cardíacos no sangue, é constante e específica, o que proporciona o estudo de suas sensibilidade e especificidade no diagnóstico. Além disso, a avaliação dos marcadores de injúria cardíaca é importante porque promove a confirmação do diagnóstico de IAM, proporciona um início precoce do tratamento adequado com, conseqüente melhora do prognóstico, permitindo um melhor acompanhamento do processo de redução no tempo de observação e menor tempo de internação (GEAC-CRF/MG, 2009).

Os marcadores bioquímicos relacionados ao desenvolvimento do IAM, de um modo geral, estão associados diretamente aos achados bioquímicos de aumento dos níveis de enzimas cardíacas como a Creatino Fosfoquinase (CPK), a Lactato desidrogenase (LDH), a Troponina I e a Creatino Fosfoquinase de Banda Muscular (CPK-MB), além de outras enzimas como as transaminases: glutâmico-oxalacética (TGO), também conhecida como aspartato-aminotransferase (AST), e a transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) ou alanina-aminotransferase (ALT). Os resultados das suas concentrações no soro são capazes de expressar o tempo de isquemia e a extensão da necrose tecidual (infarto) (BIRNBAUM *et al.*, 1997; GRUND *et al.*, 1999; VON ECKARDSTEIN *et al.*, 1999; ROBERT, 2005; SUN *et al.*, 2005; LICHTENSTEIN *et al.*; 2006 SMITH *et al.*, 2006).

Alho (*Allium sativum* L.) e suas preparações têm sido amplamente reconhecidos como agentes de prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares e outras doenças metabólicas como, aterosclerose, hiperlipidemia, trombose, hipertensão e diabetes, além de uma variedade de efeitos biológicos como atividade antimicrobiana, antiinflamatória e anticâncer, assim como capacidade de diminuir níveis de gordura e pressão ocular. Muitos desses efeitos podem estar relacionados às suas atividades antioxidantes e a presença de compostos organossulfurados específicos, incluindo sulfóxidos e γ -glutamil

peptídeos que estão presentes no alho cru (AGARWAL, 1996; YANISHLIEVA-MASLAROVA & HEINONEN, 2001; MIRON *et al.* 2002; ICHIKAWA, 2006).

Estudos experimentais e epidemiológicos têm confirmado que o alho tem significativos efeitos benéficos na prevenção de doenças isquêmicas do coração (TURNER, 1990; ISENSSE *et al.*, 1993). Alho reduz em muito os fatores de risco o qual representa um papel decisivo na gênese e progressão de doenças isquêmicas do coração, por exemplo, efeito hipolipidêmico, redução da pressão arterial sangüínea e inibição da agregação plaquetária (AGARWAL, 1996).

BREITHAUPT-GROGLER *et al.* (1997) mostraram em um estudo “in vivo”, que a ingestão regular de alho em pó (≥ 300 mg/d) por um longo período (≥ 2 anos) protegeu as células endoteliais da injúria oxidativa, tendo um efeito protetor nas propriedades elásticas da aorta, relacionadas ao envelhecimento em seres humanos. Já KIESEWETTER *et al.*(1993) mostraram que a ingestão de 800 mg/dia de alho em pó foi efetivo em pacientes com a doença oclusiva arterial periferal – Estágio II, além de uma diminuição significativa no plasma.

A prevenção do IAM relaciona-se com a identificação e controle dos fatores de risco presentes no estilo de vida dos indivíduos. Dentre esses fatores podemos citar: tabagismo, sedentarismo, estresse e obesidade (COLOMBO & AGUILLAR, 1997). Além dos fatores de risco, a ingestão de alho pode diminuir os níveis de lipídeos no plasma, reduzindo assim o processo de aterosclerose. Alicina e adenosina são os constituintes antiplaquetários mais potentes presentes no alho (AGARWAL, 1996).

Portanto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a suplementação de extrato de alho em pó liofilizado atua na redução do risco do infarto agudo do miocárdio e se há diferenças entre cultivares de alho cultivado e comercializado no Brasil.

3.2.2 Material e Métodos

3.2.2.1 Amostra

Bulbos de alhos da cultivar Peruano foram obtidos dos campos experimentais de produção da Embrapa Hortaliças (Brasília, D.F., Brasil) e bulbos da cultivar Jinxiang, importada da China, foram adquiridos da Central de Abastecimento do

Distrito Federal S.A. (Brasília, D.F., Brasil). Todos os materiais utilizados eram da safra 2008.

3.2.2.2 Processamento do alho em pó liofilizado

Os materiais foram selecionados, classificados, descascados e embalados em sacos de polietileno. Em seguida, foram congelados a temperatura de $-70 \pm 1^\circ\text{C}$ por aproximadamente 8 horas, utilizando ultra-freezer (ULT1386-5-D40, Revco, Illinois, USA). Posteriormente, foram fatiados em um processador industrial (CL50, Robot Coupe, USA) na espessura de 5 mm e imediatamente liofilizado (LS3000, Terroni, São Carlos, Brasil) por aproximadamente 3 dias. O produto então, foi moído em um moinho de facas (SL31, Solab, Piracicaba, Brasil), colocado em sacos de polietileno, fechado e mantido em um dessecador.

3.2.2.3 Determinação do teor de alicina

O teor de alicina foi quantificado por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), segundo INSTITUTE FOR NUTRACEUTICAL ADVANCEMENT (2005), conforme descrito no item 1.4.2.4.9.

3.2.3.4 Animais

Foram utilizados ratos machos Wistar ($n=30$), provenientes da Bioagri (Planaltina, Brasil), com aproximadamente 2 meses de idade e pesando entre 160 a 200 g. Durante 15 dias, os animais foram alojados individualmente em caixas de polipropileno, em sala isolada, temperatura $23 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade $55 \pm 1\%$ e fotoperíodo de 12 horas. Todos os animais tiveram livre acesso ao alimento e água. Os protocolos experimentais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso Animal, do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília, Brasil. Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 6 grupos de 5 animais. O grupo 1 recebeu dieta normolipídica (Controle). Os grupos 2 (CAP) e 3 (CACH) receberam a mesma dieta do grupo 1, acrescida do alho em pó liofilizado, sendo a cultivar Peruano para o grupo 2 e a cultivar Jinxiang para o grupo 3. O grupo 4 (HPLC) recebeu uma dieta hiperlipídica, contendo 0,125% de colato de sódio e 0,5% de colesterol (Controle

hiperlipídico). Os grupos 5 (HPLP) e 6 (HPLCH) receberam a mesma dieta do grupo 4, acrescida do alho em pó liofilizado, sendo a cultivar Peruano para o grupo 5 e a cultivar Jinxiang para o grupo 6.

3.2.3.5 Dietas

Quatro dietas purificadas foram elaboradas na forma de pellet, em conformidade com as recomendações do *American Institute of Nutrition* para roedores em crescimento (AIN – 93G), sendo: 1) Dieta normolipídica AIN93-G, 2) Dieta normolipídica AIN93-G com alho em pó, 3) Dieta hiperlipídica: dieta purificada modificada, acrescida de 0,125% de colesterol e 0,5% de colesterol, conforme o modelo de YANAGITA *et al.* (2003) e 4) Dieta hiperlipídica com alho em pó (Tabela16).

Tabela 16 – Composição das dietas experimentais

Ingredientes (g/kg)	Controle	CAP/CACH	HPLC	HPLP/HPLCH
Amido de milho [†]	529,49	524,49	523,24	518,24
Caseína (≥ 85% de proteína) [†]	200	200	200	200
Sacarose [‡]	100	100	100	100
L-cistina [†]	3	3	3	3
Óleo de soja [§]	70	70	70	70
Celulose microcristalina [†]	50	50	50	50
Mistura mineral – AIN93G [†]	35	35	35	35
Mistura vitamínica – AIN93G [†]	10	10	10	10
Bitartarato de colina [†]	2,5	2,5	2,5	2,5
Tert-butilhidroquinona [£]	0,014	0,014	0,014	0,014
Colesterol [£]	–	–	5	5
Colato de sódio [£]	–	–	1,25	1,25
Alho Liofilizado	–	5	–	5
Total	1000	1000	1000	1000

[†] Rhoister Indústria e Comércio Ltda (Vargem Grande Paulista, SP, Brasil).

[‡] Vetec Química Fina (SP, Brasil).

[§] Refinações de Milho Brasil

[£] Sigma Chemical Co.(St Louis, MO, USA).

Para a dieta complementar de alho, foi preparado o extrato aquoso de alho. A quantidade foi equivalente a 500 mg de alho em pó/kg massa do animal e diluída em 1 mL de água filtrada. A dosagem de alho foi baseada em estudos realizados por GORISTEIN *et al.* (2006). Durante o experimento a dose utilizada de alho foi ajustada de acordo com o aumento de massa dos animais experimentais.

3.2.3.6 Procedimento Experimental

O estudo foi realizado em duas etapas: a) uma com esforço físico (para avaliar o efeito do alho no IAM) e b) outra sem esforço físico (controle para o IAM).

3.2.3.6.1 Com esforço físico (CEF)

Antes de iniciar os tratamentos, os animais permaneceram em período de adaptação ao ambiente por 5 dias, recebendo dieta comercial (Labina, Purina, Brasil). Após este período, os animais dos diferentes grupos receberam suas respectivas dietas e água *ad libitum*, durante os 15 dias do estudo. Cada animal dos grupos (CAP, CACH, HPLP e HPLCH) recebeu 1 mL do extrato aquoso de alho, por gavagem. O controle do consumo de dieta foi efetuado diariamente e o controle de peso foi realizado a cada dois dias ao longo do tratamento. No final do experimento, os animais foram submetidos a um jejum alimentar de 12 horas, com água *ad libitum*. Após este período, no 16º dia, iniciou-se o teste do nado forçado até a exaustão, segundo o método de PEIXOTO (2007). Os animais passaram por um processo de exaustão, gerando assim um desequilíbrio entre a necessidade cardíaca de sangue oxigenado e seu suprimento, desenvolvendo uma isquemia. A piscina redonda tinha 50 cm de diâmetro por 80 cm de altura e uma lâmina de água contendo 70 cm. Foi utilizado um balde branco nessas dimensões simulando uma piscina redonda, contendo água em temperatura ambiente ($25 \pm 2^\circ\text{C}$). Os animais permaneceram na água durante 50 minutos, sendo submetidos a esta atividade sempre em duplas (um animal experimental mais um controle) (PEIXOTO, 2007).

Dado o início do experimento foram observados dois tipos de comportamento nesses animais, um caracterizado por *fuga* (Figura 29) aproximadamente nos dois primeiros minutos, e outro caracterizado por imobilidade (Figura 30), na tentativa de flutuar com os movimentos mínimos necessários para manter a cabeça fora da

água. Para evitar o afogamento após exaustão, este teste foi acompanhado por um examinador fazendo-se uso de um equipamento de resgate dos animais, que consistiu de uma peneira larga. Todas as vezes que os mesmos apresentarem algum sinal de afogamento, eles foram trazidos à superfície da água. O critério utilizado para a constatação de um possível afogamento foi à permanência do animal submerso, por mais de 10 segundos, sem apresentar a intenção de voltar à superfície da água.



Figura 29 – Comportamento do animal caracterizado por *fuga*, no teste de nado forçado.

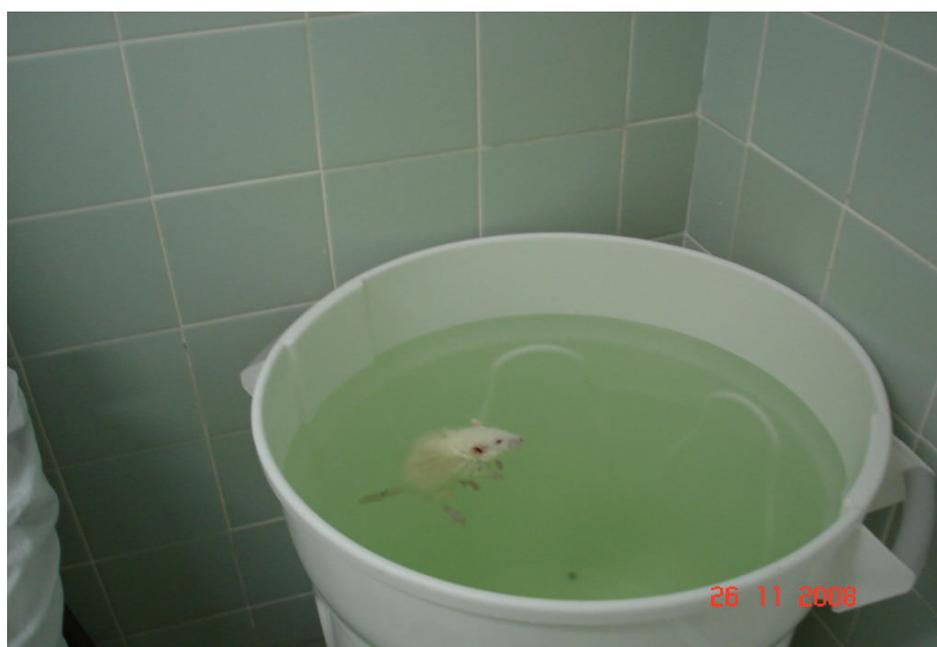


Figura 30 – Comportamento do animal caracterizado por imobilidade, no teste de nado forçado.

Após os 50 minutos regulamentares, os animais foram retirados da água e anestesiados pela via intraperitoneal com uma associação de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). A coleta de sangue foi efetuada por pulsão cardíaca. A eutanásia dos animais foi realizada com superdose de barbitúrico. O sangue foi coletado utilizando seringas e agulhas esterilizadas e imediatamente transferido para tubos de hemólise secos com tampa, estocados em reservatório contendo gelo e levados para processamento bioquímico em no máximo 1 hora após a coleta.

3.2.3.6.2 Sem esforço físico (SEF)

Os animais antes de iniciar os tratamentos permaneceram em período de adaptação ao ambiente por 5 dias, recebendo dieta comercial (Labina, Purina, Brasil). Após este período, os animais dos diferentes grupos receberam suas respectivas dietas e água *ad libitum*, durante os 15 dias do estudo. O controle do consumo de dieta foi efetuado diariamente e o controle de peso foi realizado a cada dois dias ao longo do tratamento e no final do experimento. Cada animal dos grupos (CAP, CACH, HPLP e HPLCH) recebeu 1 mL do extrato aquoso de alho, por gavagem.

A amostra de sangue de cada rato individual foi coletada no final do experimento com animais em jejum de 12 horas. Os ratos foram anestesiados pela via intraperitoneal com uma associação de quetamina (100 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg). A coleta de sangue foi efetuada por pulsão cardíaca. A eutanásia dos animais foi realizada com superdose de barbitúrico. O sangue foi coletado utilizando seringas e agulhas esterilizadas e imediatamente transferido para tubos de hemólise secos com tampa, estocados em reservatório contendo gelo e levados para processamento bioquímico em no máximo 1 hora após a coleta.

3.2.3.7 Dosagens bioquímicas associadas ao IAM

A utilização das dosagens de CK, CK-MB, LDH, TGO e TGP no sangue periférico, como indicador de IAM, baseia-se na observação de que células miocárdicas, nessas condições aqui estudadas, liberam essas enzimas citoplasmáticas no interstício durante quadros de anóxia (diminuição da quantidade

de oxigênio no sangue). A liberação dessas enzimas e a detecção dos seus níveis no sangue, horas e até dias depois do quadro de infarto, permitem uma previsão biológica do tamanho da área de infartamento do músculo cardíaco (PEIXOTO, 2007). Seguem as dosagens bioquímicas avaliadas neste estudo.

3.2.3.7.1 *Creatinoquinase (CK) ou Creatinofosfoquinase (CPK)*

A creatinoquinase (CK), também conhecida como creatinofosfoquinase (CPK) tem um papel chave no transporte de energia das células musculares. Encontra-se em altas quantidades nos músculos esqueléticos, no músculo cardíaco e no cérebro. Quantidades mínimas estão presentes no intestino e nos pulmões, porém não se encontra presente no fígado. A CK é a enzima que catalisa a passagem de um grupo fosfato da creatinofosfato para ADP (Adenosina difosfato), formando o ATP (Adenosina trifosfato). A creatinofosfato representa um papel singular na energética do músculo e outros tecidos excitáveis, funcionando como um reservatório de grupo fosfato de alta energia. É um marcador precoce para indicar lesões no músculo esquelético cardíaco (KATIR & AL-JABERI, 2001; KANAAN & HORSTMANN, 2006).

3.2.3.7.2 *Creatinoquinase fração MB (CK-MB)*

Grande parte das enzimas humanas é codificada por mais de um gene estrutural. Esses nem sempre se localizam próximos uns aos outros e muitas vezes se situam em cromossomos diferentes. Em muitos casos, durante o curso da evolução esses genes sofreram modificações, dando origem a enzimas que não mais possuíam estruturas idênticas – as isoenzimas. As isoenzimas são formas múltiplas de uma enzima possuindo a mesma atividade catalítica, mas com estruturas moleculares um pouco diferentes que possibilitam separação por eletroforese. Existem ainda isoenzimas que se originam de maneira um pouco mais complexa: representam associações diferentes dessas formas múltiplas. É o caso das isoenzimas da enzima creatinoquinase, que são dímeros resultantes de associações de duas formas protéicas ou subunidades: muscle (M) e brain (B). São assim as isoenzimas: CK-MM, CK-MB e CK-BB, sendo a forma MM presente no tecido muscular e cardíaco; a forma MB apresenta predominância no músculo cardíaco em relação ao esquelético e a forma BB se mostra abundante no tecido

nervoso e em menor proporção na musculatura lisa. Portanto, a CK-MB é o marcador mais específico para detectar lesões no miocárdio (KANAAN & HORSTMANN, 2006).

3.2.3.7.3 *Lactato Desidrogenase (LDH)*

A lactato desidrogenase (LDH) é uma enzima de transferência de hidrogênio que catalisa a oxidação do 1-lactato a piruvato com a participação do NAD como aceptor de hidrogênio. A reação é reversível, e o equilíbrio favorece fortemente a reação inversa, isto é, a redução de piruvato a lactato (Equação 9).

Equação 9: Lactato + NAD ↔ Piruvato + NADH

A atividade da LDH está presente em muitos tecidos, especialmente no coração, fígado, rins, músculos do esqueleto, células sangüíneas do cérebro e pulmões. Os níveis da enzima em vários tecidos (em U/g) são muito altos, comparados com os do soro. Os níveis teciduais são cerca de 500 vezes maiores que os normalmente encontrados no soro, e o vazamento da enzima, mesmo de uma pequena massa de tecido lesado, pode aumentar o nível observado de LDH no soro por um grau significativo. Sua dosagem no soro é principalmente empregada para avaliar doenças cardíacas (infarto do miocárdio), além de doenças hepáticas, anemias, traumas musculares e distrofia muscular (KANAAN & HORSTMANN, 2006).

3.2.3.7.4 *Transaminase glutâmico oxalacética (TGO)*

Também chamada aspartato aminotransferase (AST), antigamente chamada transaminase glutâmica-oxaloacética de soro, é uma de duas enzimas que catalisam a conversão da porção nitrogenada de um aminoácido para um resíduo de aminoácido. Essencial para a produção de energia no ciclo de Krebs, a TGO é encontrada no citoplasma e mitocôndrias de muitas células, primeiramente, no fígado, coração, músculos esqueléticos, rins, pâncreas e hemácias. Auxilia na detecção e diagnóstico diferencial de doença hepática aguda; monitora o progresso

do paciente e o prognóstico em doenças cardíacas e hepáticas e auxilia no diagnóstico do IAM em correlação aos níveis de CK e LDH (LABES, 2009).

Os níveis de TGO flutuam em resposta à extensão da necrose celular, mostrando elevações transientes mínimas no início do processo da doença e elevações extremas durante a maior parte da fase aguda. A elevação em níveis de TGO indica aumento da gravidade da doença e comprometimento dos tecidos; uma diminuição indica resolução da doença e recuperação dos tecidos (LABES, 2009).

3.2.3.7.5 *Transaminase glutâmico pirúvica (TGP)*

Também chamada alanina aminotransferase (ALT), é necessária para a produção de energia do tecido. Ela é uma das duas enzimas que catalisam uma reação de transferência de grupo amina reversível no ciclo de Krebs. A TGP ou ALT aparece, primariamente, em citoplasma hepatocelular, com quantidades menores nos rins, coração e músculos esqueléticos e é um indicador de comprometimento hepatocelular agudo. Este teste é usado para medir os níveis de TGP sérico. Os níveis anormalmente altos podem permanecer elevados por dias ou semanas. Elevações marginais, ocasionalmente, ocorrem em infarto agudo do miocárdio, refletindo congestão hepática secundária ou a liberação de pequenas quantidades de TGP do tecido do miocárdio (LABES, 2009).

3.2.3.8 Dosagens bioquímicas associadas ao metabolismo lipídico

As alterações cardíacas associadas ao IAM passa antes pelo entendimento dos seus fatores de risco. Assim, foi também determinado um estudo das principais dosagens bioquímicas associadas aos fatores de risco para o IAM e para o desenvolvimento da aterosclerose, que foram o Colesterol Total, Lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol), Lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-colesterol), Triglicerídeos e Glicose, sendo realizadas em todos os grupos de estudo (Controle, CAP, CACH, HPLC, HPLP e HPLCH) nos quais foram ou não submetidos ao esforço físico através do nado forçado.

3.2.3.9 Análises enzimáticas

O plasma foi separado por centrifugação (centrífuga SIGMA, 2-5, Osterode am Harz, Alemanha) a 366,5 rad/s, por 10 min, em temperatura ambiente e foi feito processamento imediato das amostras. Os ensaios bioquímicos, por meio de sistemas enzimáticos específicos, foram realizados conforme critérios pré-estabelecidos pelo fabricante de cada “kit” para as seguintes dosagens: Triglicerídeos (ABBOTT); Colesterol total (ABBOTT); Lipoproteínas de alta densidade (HDL-colesterol) direto, sem precipitação (ABBOTT); glicose (ABBOTT); CK (ABBOTT); CK-MB (ABBOTT); LDH (ABBOTT); TGO (ABBOTT) e TGP (ABBOTT). A leitura dos teores de cada um dos componentes anteriormente descritos foi realizada em equipamento automatizado ARCHITECH C8000 do Centro de Patologia Clínica, do Hospital Universitário de Brasília (HUB, Brasília, Brasil). A fração das lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL-colesterol) foi calculada pela seguinte equação, de acordo com FRIEDEWALD *et al.* (1972): VLDL-colesterol=(Triglicerídeos/5) utilizadas para valores de triglicerídeos menores que 400 mg/dL.

3.2.3.10 Transformação da dosagem do estudo animal para o humano

A dose animal não deve ser extrapolada para a dose humana equivalente, pela simples conversão baseada no peso corpóreo (REAGAN-SHAW *et al.*, 2007). A *Food and Drug Administration* (FDA) tem sugerido que a extrapolação da dose animal para a dose humana é corretamente executada somente através da normalização pela área da superfície corpórea (ASC), a qual é frequentemente representada em mg/m² (Tabela 17). A dose humana equivalente pode ser calculada pela seguinte equação:

$$\text{Equação 10: DHE} = \text{Dose animal (mg/kg)} \times \frac{K_m \text{ Animal}}{K_m \text{ Humano}}$$

Sendo:

DHE= Dose humana equivalente;

$K_m \text{ Animal}$ = Fator de conversão, utilizado para converter mg/kg dose utilizado no estudo para a dose em mg/m² do animal experimental;

K_m Humano = Fator de conversão, utilizado para converter mg/kg dose utilizado no estudo para a dose em mg/m² da espécie humana.

Tabela 17 – Conversão da dose animal para DHE baseado em ASC.

Espécies	Peso (kg)	ASC (m²)	Fator K_m
Humano			
Adulto	60	1,6	37
Criança	20	0,8	25
Babuíno	12	0,6	20
Cachorro	10	0,5	20
Macaco	3	0,24	12
Coelho	1,8	0,15	8
Porquinho-da-Índia	0,4	0,05	8
Rato	0,15	0,025	6
Hamster	0,08	0,02	5
Camundongo	0,02	0,007	3

Valores baseados nos dados da FDA Draft Guidelines. Para converter a dose em mg/kg para dose em mg/m², multiplicar pelo fator K_m.

3.2.3.11 Delineamento experimental

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado com 6 tratamentos, com 5 repetições. Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e todas as diferenças foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5% (p<0,05). Os valores de cada resultado foram expressos pela média ± desvio padrão.

3.2.4 Resultados e Discussão

3.2.4.1 Teor de alicina

O teor de alicina (mg/g do produto em matéria seca) no extrato aquoso de alho liofilizado foram os seguintes: cultivar Peruano (27,04 ± 0,32) e cultivar Jinxiang (1,88 ± 0,26). A diferença nos resultados se deve a instabilidade da alicina que pode

variar durante o processamento (FREEMAN & KODERA, 1995). Segundo LAWSON & HUGHES (1992) o valor encontrado de alicina em alho em pó correspondeu a 7,52 mg/g pó, sendo o processamento obtido por secagem a 60°C até peso constante de fatias de alho, com 3 mm de espessura. O tempo de secagem correspondeu a aproximadamente 57 horas e foi seguida de pulverização utilizando um moinho. O extrato de alho em pó foi obtido da adição de água (20 mL/g) e incubado a 23°C por 5 min. No mesmo estudo, os autores avaliaram os efeitos da secagem do alho na produção de tiosulfonatos. A quantidade de alicina formada no produto fresco correspondeu a 12,1 mg/g produto em matéria seca e no alho em pó foi de 1,6 mg/g pó. A perda obtida pela secagem foi de 4%. Neste estudo foram obtidos valores para o alho em pó em relação ao estudo conduzido por LAWSON & HUGHES. Segundo HOLUB (2002), problemas aumentam quando diferentes métodos de secagem são utilizados. A homogeneização do alho por *spray-drier* resulta na perda da enzima alliinase, o mesmo ocorrendo com métodos de secagem em temperaturas muito altas. Secagem em forno a temperaturas baixas (<60°C) tem pouco efeito na produção dos principais tiosulfonatos (alicina e alil metil tiosulfonato). Em outro estudo LAWSON *et al.* (1991a) avaliaram a composição dos principais tiosulfonatos, entre eles a alicina presentes em tabletes de alho em pó comercializados no mercado da Austrália, Alemanha, Estados Unidos e Japão. Os valores encontrados corresponderam a 3,60 mg/g produto (Austrália); 3,10 mg/g produto (Estados Unidos); 0,26 a 2,55 mg/g produto (Alemanha) e não detectado (Japão). Segundo os autores, essa ampla variação foi devida a procedimentos diferentes de processamento utilizado no preparo do alho em pó.

O alho em pó tem o potencial de preservar a capacidade de liberação da alicina do alho, entretanto enquanto alguns alhos em pó liberam grande quantidade de alicina em contato com a água, muitos não indicam variação nos métodos de produção de alho em pó (LAWSON *et al.*, 1991a). Desta forma, podemos considerar possíveis variações nos resultados.

3.2.4.2 Efeito do alho em pó no peso corpóreo

A suplementação de alho em pó liofilizado nas dietas normolipídica e hiperlipídica influenciou no peso corpóreo dos animais experimentais. Ratos alimentados com alho em pó liofilizado da cultivar Peruano (CAP e HPLP)

apresentaram menor peso corpóreo, ganho de peso após os 15 dias do estudo e consumiram menor quantidade de ração em relação aos demais grupos. A dieta hiperlipídica controle não apresentou diferença significativa no peso corpóreo, ganho de peso e consumo da ração em relação à dieta normolipídica controle (Tabela 18).

Tabela 18 – Efeito do alho em pó liofilizado nas dietas normolipídicas e hiperlipídicas em relação ao peso corpóreo, ganho de peso e consumo da ração nos grupos de ratos (CEF)¹.

Grupo de estudo*	Peso corpóreo (g) 1° dia*	Peso corpóreo (g) 15° dia*	Ganho de peso (%)	Consumo da ração (g/dia)
1 Controle	191,43 ± 11,35 a	257,92 ± 22,35 a	34,62 ba	27,61 ± 2,44 a
2 CAP	186,28 ± 5,69 a	230,53 ± 7,94 b	23,81 c	24,86 ± 2,15 cb
3 CACH	193,87 ± 6,54 a	253,66 ± 12,22 a	30,84 b	27,17 ± 2,40 ca
4 HPLC	192,66 ± 3,53 a	271,09 ± 8,87 a	40,72 a	29,07 ± 2,63 a
5 HPLP	189,80 ± 11,56 a	241,63 ± 6,63 b	27,58 c	24,20 ± 1,64 b
6 HPLCH	189,71 ± 6,83 a	257,85 ± 15,41 a	36,58 ba	26,29 ± 1,32 a

*Controle: dieta controle normolipídica; CAP: dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano; CACH: dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang; HPLC: dieta controle hiperlipídica; HPLP: dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano e HPLCH: dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang.

¹Resultados expressos como média ± desvio padrão (dp), n=5.

^{ab}Letras diferentes, em uma mesma coluna, e em diferentes ensaios, indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

O resultado referente ao grupo HPLP assemelha-se ao estudo conduzido por CHI *et al* (1982), na qual ratos alimentados com 1% de colesterol e 15% de gordura de porco e suplementado com 2% e 4% de alho em pó liofilizado durante 4 semanas, apresentaram diminuição significativa na ingestão de ração e ganho de peso no grupo com dieta de colesterol suplementada com 2% de alho. Outros estudos suplementados com alho em pó não mostraram alteração na ingestão de ração e ganho de peso (ALI *et al.*, 2000; AOUDI *et al.*, 2000).

Os resultados mostram que o alho da cultivar Peruano pode ajudar na perda de peso, diminuindo o apetite. O possível mecanismo da redução do apetite se deve ao forte odor do alho, que estimula o centro de saciedade no cérebro, à leptina e desse modo reduz à vontade de comer. Ou o alho pode estimular o sistema nervoso a liberar hormônios como a adrenalina e esses hormônios podem acelerar a taxa metabólica ajudando na perda de peso (MEDSPICE, 2009).

Como o alho Peruano possui maior quantidade de alicina, conseqüentemente possui um maior odor pungente, gerando um estímulo maior no cérebro ou acelerando a taxa metabólica.

3.2.4.3 Efeito do alho em pó nas dosagens bioquímicas associadas ao IAM

3.2.4.3.1 CK

Nas dosagens de CK (Figura 31), a suplementação de extrato de alho em pó liofilizado para o grupo SEF (sem esforço físico) nas dietas normolipídicas apresentaram redução significativa no grupo CACH (32%) em relação ao Controle. Para as dietas hiperlipídicas verificou-se que houve redução significativa nos grupos HPLP (26%) e HPLCH (38%) em relação ao controle hiperlipídico (HPLC). Já para o grupo CEF (com esforço físico) nas dietas normolipídicas verificou-se que o nado forçado aumentou significativamente as concentrações de CK, dos grupos CAP (53%) e CACH (56%). Nas dietas hiperlipídicas não houve alteração dos grupos HPLP e HPLCH em relação ao controle hiperlipídico (HPLC).

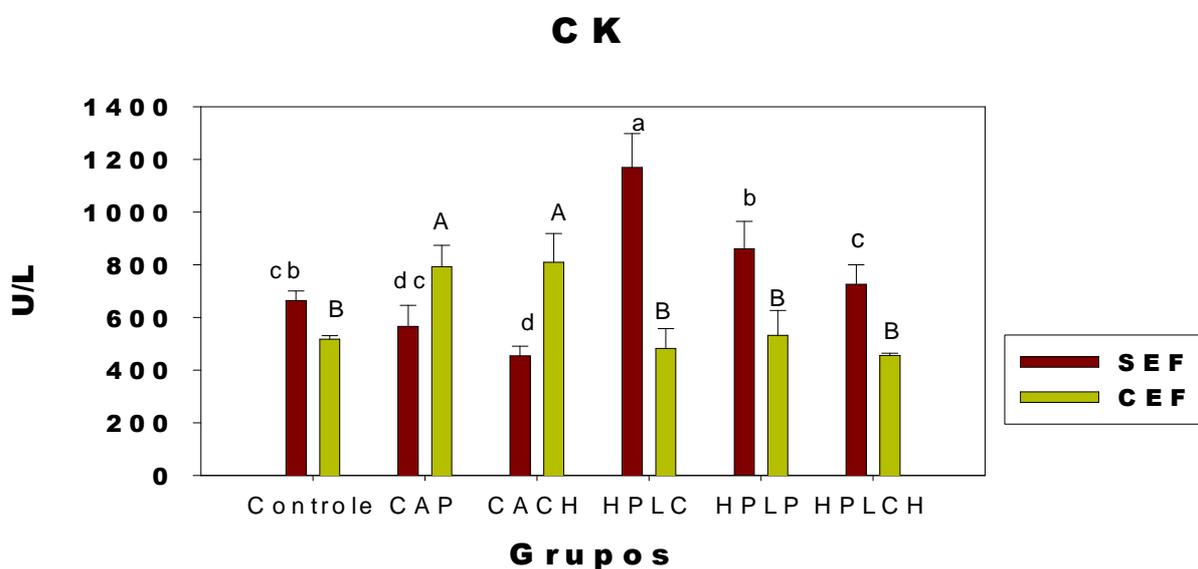


Figura 31 - Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de CK de animais (n=5) dos grupos: Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Com os dados apresentados em barras representando média \pm d.p. (média \pm desvio padrão) e a diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos SEF (ab) e CEF (AB). SEF= sem esforço físico; CEF= com esforço físico (submetidos ao esforço físico por meio do nado forçado).

3.2.4.3.2 CK-MB

Nas dosagens de CK-MB (Figura 32), a suplementação de extrato de alho em pó liofilizado para o grupo SEF (sem esforço físico) nas dietas normolipídicas apresentaram redução significativa no grupo CACH (30%) em relação ao Controle. Para as dietas hiperlipídicas verificou-se que houve redução significativa nos grupos HPLP (18%) e HPLCH (36%) em relação ao controle hiperlipídico (HPLC). Já para o grupo CEF (com esforço físico) nas dietas normolipídicas verificou-se que o nado forçado aumentou significativamente as concentrações de CK-MB, tanto para o grupo CAP (55%) e CACH (102%), ou seja, o processo de exaustão gerou uma isquemia. Nas dietas hiperlipídicas não houve alteração dos grupos HPLP e HPLCH em relação ao controle hiperlipídico (HPLC).

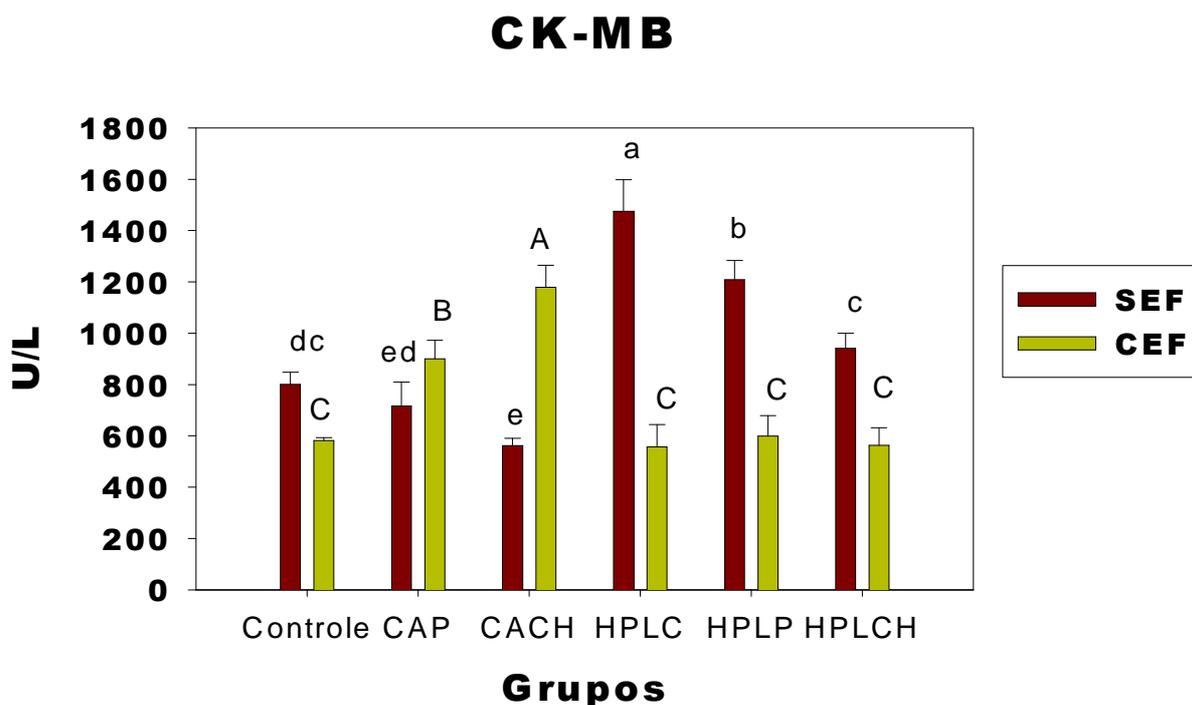


Figura 32 - Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de CK-MB de animais (n=5) dos grupos: Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Com os dados apresentados em barras representando média \pm d.p. (média \pm desvio padrão) e a diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos SEF (ab) e CEF (AB).

SEF= sem esforço físico; CEF= com esforço físico (submetidos ao esforço físico por meio do nado forçado).

Os valores de referências para CK-MB são de particular interesse, pois esta enzima está sendo o melhor marcador sérico da injúria do miocárdio. A atividade de CK-MB no miocárdio é aproximadamente de 14%, 22% ou 42% da atividade do CK total (LOTT & STANG, 1980). Neste estudo foi encontrado para o grupo CAP em condições normolipídicas e que realizaram esforço físico através do nado forçado valores de CK-MB de 14% em relação à atividade do CK total, indicando injúria no miocárdio.

3.2.4.3.3 LDH

Nas dosagens de LDH (Figura 33), a suplementação de extrato de alho em pó liofilizado para o grupo SEF (sem esforço físico) entre as dietas normolipídicas não houve diferença significativa. Para as dietas hiperlipídicas houve redução significativa no grupo HPLP (48%) em relação ao controle hiperlipídico (HPLC) e nenhuma alteração para o grupo HPLCH. Já para o grupo CEF (com esforço físico) nas dietas normolipídicas o nado forçado não houve diferença significativas as dosagens de LDH. Nas dietas hiperlipídicas houve aumento significativo para o grupo HPLCH (118%) e para o grupo HPLP não houve alteração em relação ao controle hiperlipídico (HPLC).

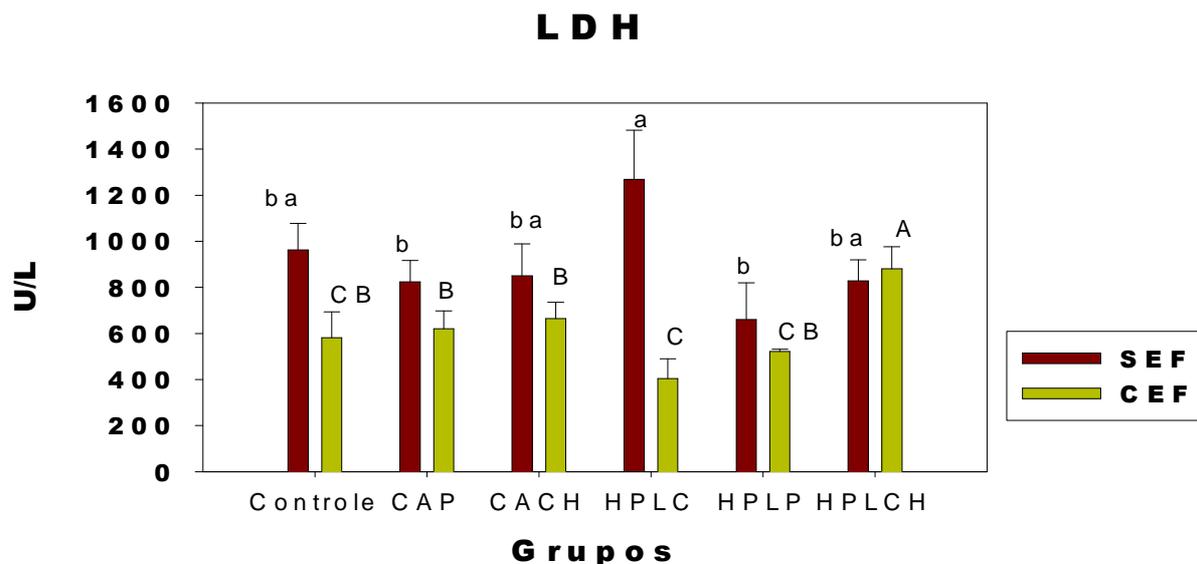


Figura 33 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de LDH de animais (n=5) dos grupos: Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Com os dados apresentados em barras representando média \pm d.p. (média \pm desvio padrão) e a diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos SEF (ab) e CEF (AB).

SEF= sem esforço físico; CEF= com esforço físico (submetidos ao esforço físico por meio do nado forçado).

3.2.4.3.4 TGO

Nas dosagens de TGO (Figura 34), a suplementação de extrato de alho em pó liofilizado para o grupo SEF (sem esforço físico) nas dietas normolipídicas não apresentaram diferença significativa em relação ao Controle e nas dietas hiperlipídicas não apresentaram diferença significativa em relação ao controle hiperlipídico (HPLC). Para o grupo CEF (com esforço físico) nas dietas normolipídicas o nado forçado aumentou significativamente as concentrações para o grupo CACH (44%). O grupo CAP não apresentou diferença significativa. Nas dietas hiperlipídicas não houve alteração dos grupos HPLP e HPLCH em relação ao controle hiperlipídico (HPLC).

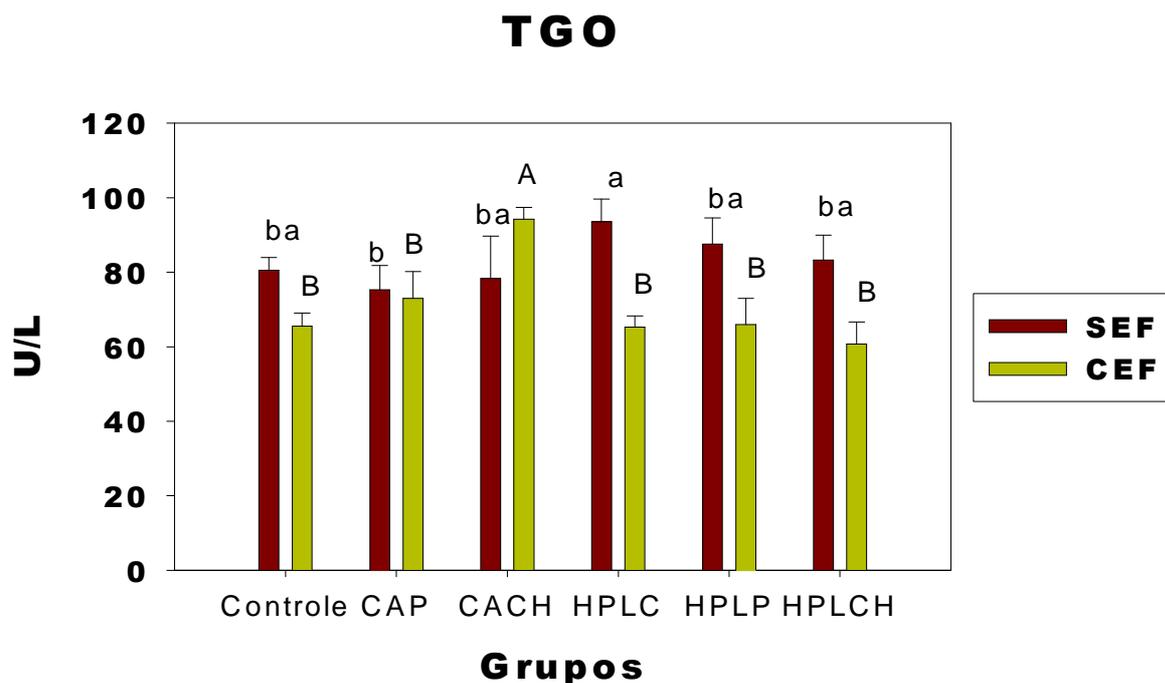


Figura 34 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de TGO de animais (n=5) dos grupos: Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Com os dados apresentados em barras representando média \pm d.p. (média \pm desvio padrão) e a diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos SEF (ab) e CEF (AB).

SEF= sem esforço físico; CEF= com esforço físico (submetidos ao esforço físico por meio do nado forçado).

3.2.4.3.5 TGP

Nas dosagens de TGP (Figura 35), a suplementação de extrato de alho em pó liofilizado para o grupo SEF (sem esforço físico) nas dietas normolipídicas houve aumento significativo para o grupo CACH (61%) em relação ao Controle e o grupo CAP não apresentou alteração. Nas dietas hiperlipídicas houve redução significativa para o grupo HPLP (7%) e não houve alteração para o grupo HPLCH, quando comparado ao controle hiperlipídico (HPLC). Para o grupo CEF (com esforço físico) nas dietas normolipídicas o nado forçado aumentou significativamente as concentrações para o grupo CACH (46%). O grupo CAP não apresentou diferença significativa. Nas dietas hiperlipídicas não houve alteração dos grupos HPLP e HPLCH em relação ao controle hiperlipídico (HPLC).

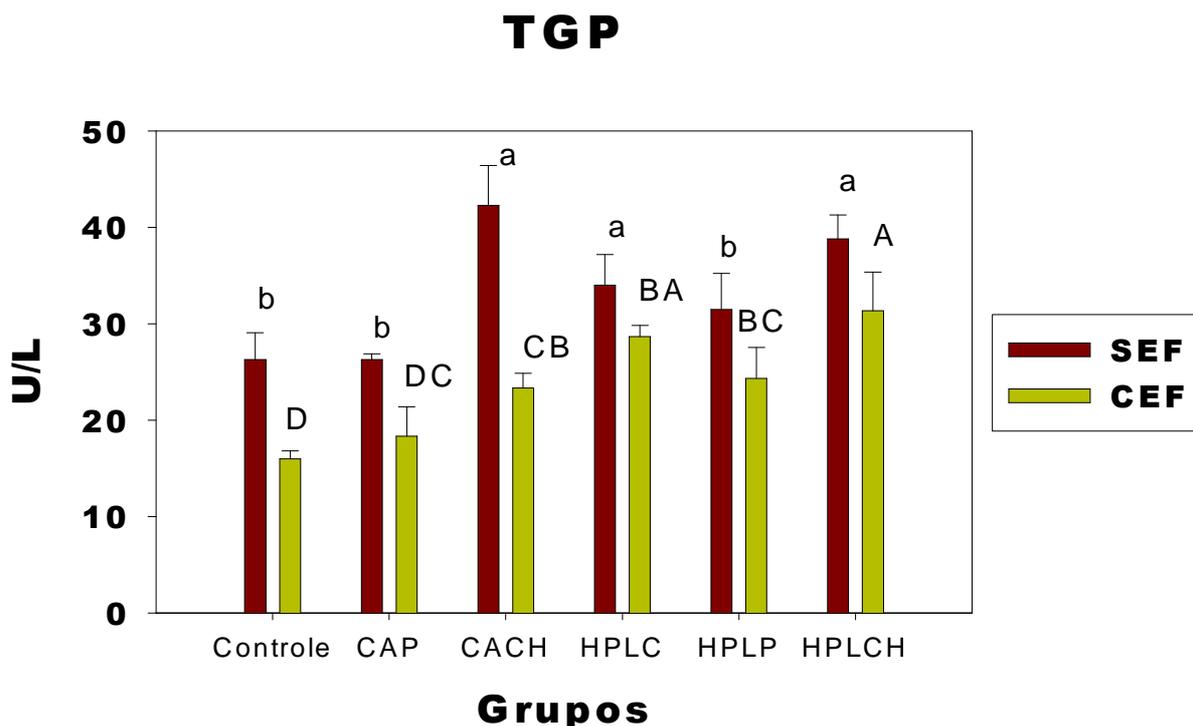


Figura 35 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de TGP de animais (n=5) dos grupos: Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Com os dados apresentados em barras representando média \pm d.p. (média \pm desvio padrão) e a diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos SEF (ab) e CEF (AB). SEF= sem esforço físico; CEF= com esforço físico (submetidos ao esforço físico por meio do nado forçado).

Os resultados obtidos neste estudo mostram que ratos suplementados com extrato de alho em pó da cultivar Peruano (CAP) e que não realizaram atividade física exaustiva (SEF) em condições normolipídicas não apresentaram alterações significativas nas dosagens bioquímicas referentes ao IAM. Já, o alho da cultivar Jinxiang (CACH) nas mesmas condições apresentou fator redutor da ação oxidativa sobre o músculo cardíaco, devido a redução nas dosagens de CK e CK-MB. Porém, a dosagem de TGP elevada indica comprometimento hepatocelular.

Em condições hiperlipídicas e SEF, o grupo suplementado com extrato de alho em pó da cultivar Peruano (HPLP) apresentou redução significativa nas dosagens bioquímicas referentes ao IAM (CK, CK-MB, LHD e TGP). Segundo HOSHIDA *et al.*(2000), hipercolesterolemia é o maior fator de risco para doenças vasculares isquêmicas. Desta forma o grupo HPLP que não sofreu esforço físico

possui este fator de risco devido à condição hiperlipídica, mas com a suplementação de alho pode colaborar na sua redução (índices para o IAM reduzidos). Para o grupo suplementado com alho da cultivar Jinxiang (HPLCH) e nas mesmas condições do estudo apresentou redução significativa nas dosagens (CK e CK-MB) e não houve alteração nas dosagens de LDH, TGO e TGP. Portanto, o grupo HPLCH atua na redução do risco para o IAM.

Com relação aos resultados referentes as dosagens bioquímicas dos grupos de animais que foram submetidos ao esforço físico através do nado forçado (CEF) em condições normolipídicas e que foram suplementados com alho apresentaram fator de risco ao IAM, sendo a cultivar Peruano (CAP), devido as dosagens de CK e CK-MB elevadas e para a cultivar Jinxiang (CACH) pelas dosagens de CK, CK-MB, TGO e TGP elevadas.

Em condições hiperlipídicas e CEF, o grupo suplementado com extrato de alho em pó da cultivar Peruano (HPLP) não apresentou alteração nos marcadores referentes ao IAM (CK, CK-MB, LDH, TGO e TGP). Segundo BABA *et al.* (1976), mudanças nas atividades no soro de TGO, CK e suas isoenzimas, e LDH podem refletir mudanças patológicas no coração e CK-MB está presente em atividade significativa somente no miocárdio, aparecendo no sangue em quantidades maiores do que 3 a 4% do CK total, sendo usualmente ponto de injúria do miocárdio. Desta forma, o grupo HPLP não apresentou alterações patológicas no coração e injúria no miocárdio, sugerindo que a suplementação de alho da cultivar Peruano atuou de forma benéfica como agente protetor ao risco cardiovascular. Quando os ratos foram suplementados com alho da cultivar Jinxiang (HPLCH) não houve alteração nos seguintes marcadores referentes ao IAM (CK, CK-MB, TGO e TGP), porém houve aumento significativo nas dosagens de LDH. A dosagem alterada de LDH de forma isolada sugere um possível dano em outros órgãos (fígado, rins, músculos do esqueleto, células sangüíneas do cérebro ou pulmões). Portanto, este grupo não atua na redução do risco do IAM.

O exercício físico pode alterar as dosagens bioquímicas de TGO, CK e LDH. Há um aumento de CK no sangue, assim como de TGO e LDH, mas tem sido visto que a mudança foi geralmente muito menor do que a CK (MILLAR, 1978). Com relação à dosagem de CK-MB exercícios moderados podem apresentar traços de CK-MB no sangue e somente exercícios extremos resultará em mais de três vezes os valores de referência para a atividade de CK-MB (OLIVIER *et al.*, 1978;

KIELBLOCK *et al.*, 1979). Neste estudo o grupo CAP e HPLP apresentaram valores 0,5 e 0,1 vezes os valores de referência. Sendo os valores de referência os grupos Controle e HPLC, respectivamente. Esses resultados sugerem que o exercício físico através do nado forçado utilizado neste estudo não é considerado como um exercício extremo.

Há vários estudos relacionando a ação do alho como agente anticoagulante (BORDIA *et al.*, 1977; SAINANI *et al.*, 1979); regulador de gordura (SAINANI *et al.*, 1979a; JAIN, 1975); antihipertensivo (SILAGY & NEIL, 1994a); redução dos níveis de colesterol sérico (LAU *et al.*, 1987; JAIN, 1975; WARSHAFSKY *et al.*, 1993) e triglicerídeos (SAINANI *et al.*, 1979a), mas muito poucos estudos relacionando a ingestão de alho com o IAM, o que dificulta a comparação dos resultados deste estudo.

3.2.4.4 Dosagens bioquímicas associadas ao metabolismo lipídico

3.2.4.4.1 *Colesterol Total*

Nas dosagens de colesterol total (Figura 36), a suplementação de extrato de alho em pó liofilizado para o grupo SEF (sem esforço físico) nas dietas normolipídicas houve aumento significativo o grupo CACH (26%) em relação ao Controle e o grupo CAP não apresentou alteração. Nas dietas hiperlipídicas não houve diferença significativa nos grupos HPLP e HPLCH em relação ao controle hiperlipídico (HPLC). Para o grupo CEF (com esforço físico) nas dietas normolipídicas o nado forçado não alterou as concentrações de colesterol total. Nas dietas hiperlipídicas houve redução significativa para o grupo HPLP (12%) e aumento significativo para o grupo HPLCH (20%) quando comparado ao controle hiperlipídico (HPLC).

Colesterol Total

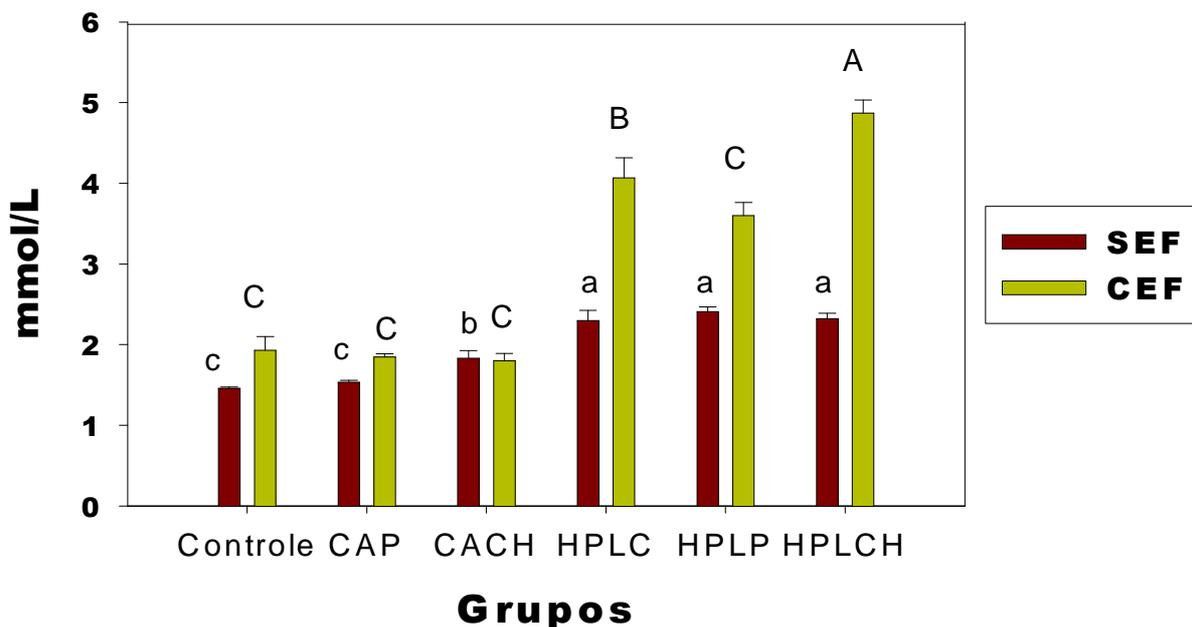


Figura 36 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de Colesterol Total de animais ($n=5$) dos grupos: Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Com os dados apresentados em barras representando média \pm d.p. (média \pm desvio padrão) e a diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos SEF (ab) e CEF (AB).

SEF= sem esforço físico; CEF= com esforço físico (submetidos ao esforço físico por meio do nado forçado).

3.2.4.4.2 HDL-Colesterol

Nas dosagens de HDL-Colesterol (Figura 37), a suplementação de extrato de alho em pó liofilizado para o grupo SEF (sem esforço físico) nas dietas normolipídicas não apresentaram diferença significativa em relação ao Controle e nas dietas hiperlipídicas houve aumento significativo para os grupo HPLP (13%) e HPLCH (14%) em relação ao controle hiperlipídico (HPLC). Para o grupo CEF (com esforço físico) nas dietas normolipídicas o nado forçado não alterou as concentrações de HDL-Colesterol. Nas dietas hiperlipídicas houve aumento para os grupos HPLP (23%) e HPLCH (25%) quando comparado ao controle hiperlipídico (HPLC).

HDL-Colesterol

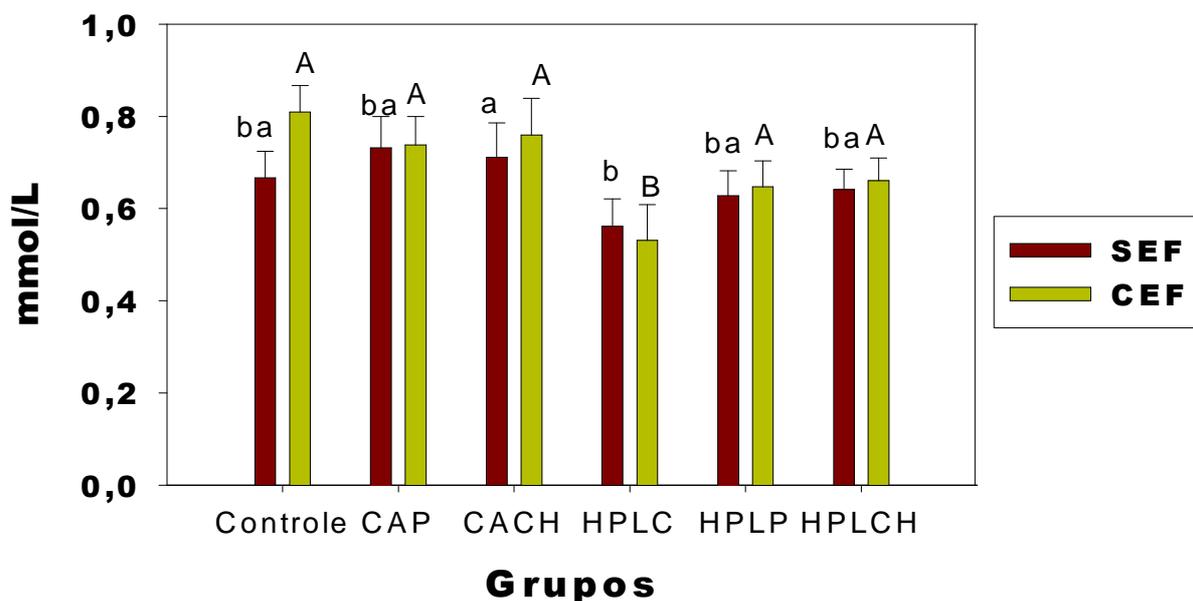


Figura 37 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de HDL-Colesterol de animais (n=5) dos grupos: Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Com os dados apresentados em barras representando média \pm d.p. (média \pm desvio padrão) e a diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos SEF (ab) e CEF (AB). SEF= sem esforço físico; CEF= com esforço físico (submetidos ao esforço físico por meio do nado forçado).

3.2.4.4.3 VLDL-Colesterol

Nas dosagens de VLDL-Colesterol (Figura 38), a suplementação de extrato de alho em pó liofilizado para o grupo SEF (sem esforço físico) nas dietas normolipídicas apresentou diminuição significativa para os grupos CAP (35%) e CACH (38%) em relação ao Controle e nas dietas hiperlipídicas não houve diferença significativa entre os grupos HPLP e HPLCH em relação ao controle hiperlipídico (HPLC). Para o grupo CEF (com esforço físico) nas dietas normolipídicas e hiperlipídicas o nado forçado não alterou as concentrações de VLDL-Colesterol.

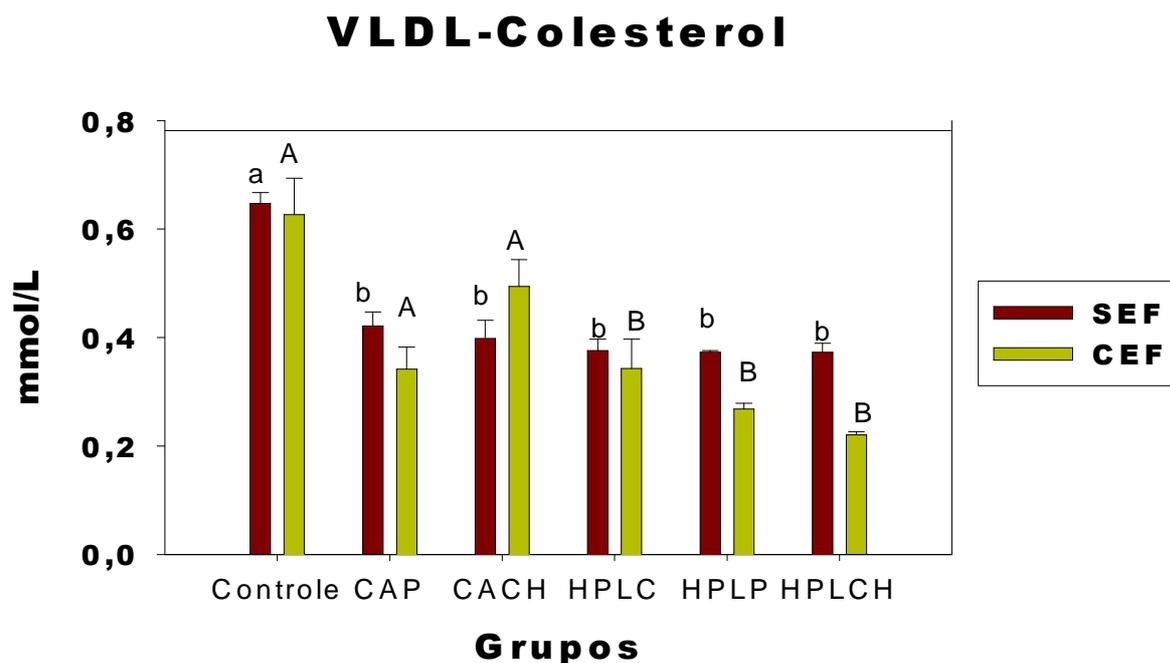


Figura 38 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de VLDL-Colesterol de animais (n=5) dos grupos: Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Com os dados apresentados em barras representando média \pm d.p. (média \pm desvio padrão) e a diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos SEF (ab) e CEF (AB).

SEF= sem esforço físico; CEF= com esforço físico (submetidos ao esforço físico por meio do nado forçado).

3.2.4.4 Triglicerídeos

Nas dosagens de Triglicerídeos (Figura 39), a suplementação de extrato de alho em pó liofilizado para o grupo SEF (sem esforço físico) nas dietas normolipídicas apresentaram redução significativa dos grupos CAP (35%) e CACH (38%) em relação ao Controle e nas dietas hiperlipídicas não houve alteração dos grupos HPLP e HPLCH em relação ao controle hiperlipídico (HPLC). Para o grupo CEF (com esforço físico) nas dietas normolipídicas o nado forçado reduziu significativamente as concentrações de Triglicerídeos para os grupos CAP (45%) e CACH (21%). Nas dietas hiperlipídicas houve redução significativa para o grupo HPLCH (36%) quando comparado ao controle hiperlipídico (HPLC). O grupo HPLP também reduziu a concentração de triglicerídeos, porém não foi significativo.

Triglicerídeos

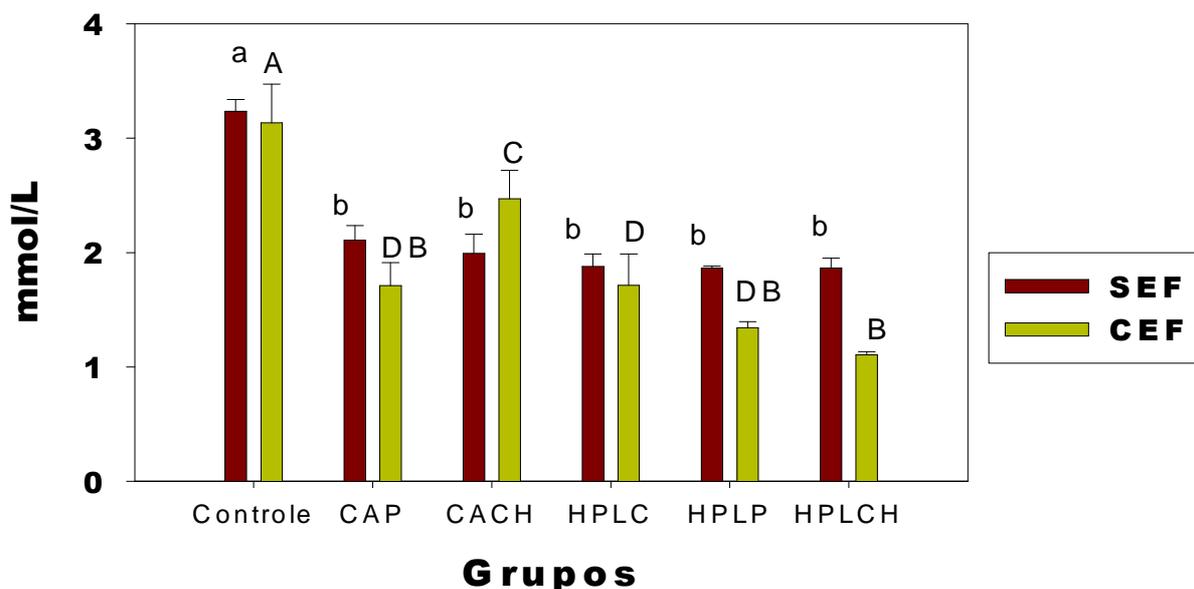


Figura 39 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de Triglicerídeos de animais ($n=5$) dos grupos: Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Com os dados apresentados em barras representando média \pm d.p. (média \pm desvio padrão) e a diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos SEF (ab) e CEF (AB).

SEF= sem esforço físico; CEF= com esforço físico (submetidos ao esforço físico por meio do nado forçado).

3.2.4.4.5 Glicose

Nas dosagens de Glicose (Figura 40), a suplementação de extrato de alho em pó liofilizado para o grupo SEF (sem esforço físico) nas dietas normolipídicas houve aumento significativo do grupo CACH (12%) e nenhuma alteração no grupo CAP quando comparado ao Controle. Nas dietas hiperlipídicas houve aumento significativo dos grupos HPLP (59%) e HPLCH (65%) em relação ao controle hiperlipídico (HPLC). Para o grupo CEF (com esforço físico) nas dietas normolipídicas o nado forçado reduziu significativamente as concentrações de Glicose para os grupos CAP (43%) e CACH (17%). Nas dietas hiperlipídicas não houve alteração do grupo HPLCH em relação ao controle hiperlipídico (HPLC) e houve aumento significativo para o grupo HPLP (41%) em relação ao grupo HPLC.

Glicose

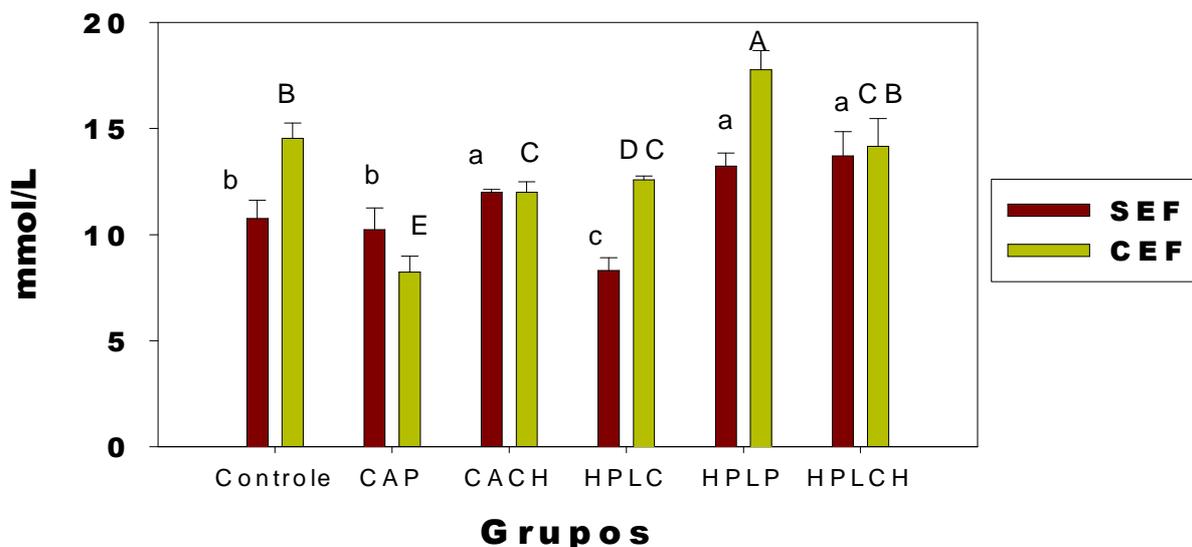


Figura 40 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas de Glicose de animais (n=5) dos grupos: Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Com os dados apresentados em barras representando média \pm d.p. (média \pm desvio padrão) e a diferença estatística ($p < 0,05$) entre os grupos SEF (ab) e CEF (AB).

SEF= sem esforço físico; CEF= com esforço físico (submetidos ao esforço físico por meio do nado forçado).

Os resultados obtidos neste estudo referentes as dosagens bioquímicas associadas ao metabolismo lipídico mostraram que ratos suplementados com extrato de alho em pó liofilizado e que não realizaram atividade física exaustiva (SEF) em condições normolipídicas para a cultivar Peruano (CAP) apresentou redução significativa nas concentrações de VLDL-colesterol e Triglicerídeos. Não houve alteração nas concentrações de Colesterol total, HDL – colesterol e Glicose. Esse perfil lipídico indica um efeito anti-aterogênico. Já, a cultivar Jinxiang (CACH) nas mesmas condições apresentou diminuição significativa nas concentrações de VLDL-colesterol e Triglicerídeos, aumento significativo nas dosagens de Colesterol total e Glicose e nenhuma alteração no HDL-colesterol. Este resultado indicou um fator aterogênico.

Em condições hiperlipídicas e SEF, o grupo suplementado com extrato de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano (HPLP) apresentou aumento significativo nas dosagens de Glicose. Não houve alteração nas concentrações de Colesterol

total, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e Triglicerídeos. Para o grupo suplementado com alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang (HPLCH) houve aumento significativo nas dosagens de HDL-colesterol e Glicose. Não houve alteração nas dosagens de Colesterol total, VLDL-colesterol e Triglicerídeos. Ambas as situações apresentaram efeito aterogênico.

Com relação aos resultados referentes as dosagens bioquímicas dos grupos de animais que foram submetidos ao esforço físico através do nado forçado (CEF) em condições normolipídicas e que foram suplementados com alho em pó liofilizado das cultivares Peruano (CAP), não apresentaram alteração nas concentrações de Colesterol total, HDL-colesterol, VLDL-colesterol e Glicose. Houve redução significativa na dosagem de Triglicerídeos. Para o alho em pó da cultivar Jinxiang (CACH) nas mesmas condições do estudo mostraram diminuição significativa nas concentrações de Triglicerídeos e Glicose e nenhuma alteração nas dosagens de redução nas dosagens de VLDL-colesterol e Triglicerídeos e nenhuma alteração no HDL-colesterol. Ambas as cultivares apresentaram efeito anti-aterogênico.

Em condições hiperlipídicas e CEF, o grupo suplementado com alho em pó liofilizado da cultivar Peruano (HPLP) apresentou redução significativa nas concentrações de Colesterol total, aumento nas dosagens de HDL-colesterol e Glicose e nenhuma alteração nas concentrações de VLDL-colesterol e Triglicerídeos. Para o alho em pó da cultivar Jinxiang (CACH) nas mesmas condições do estudo mostraram diminuição significativa nas concentrações de VLDL-colesterol e Triglicerídeos, aumento no Colesterol total e nenhuma alteração nas dosagens de redução nas dosagens de HDL-colesterol e Glicose. Neste caso, as alterações geradas mostram fator aterogênico.

Uma das respostas biológicas do alho tem sido atribuída a redução de fatores de risco para doenças cardiovasculares, entre eles, o efeito anti-aterogênico. Aterosclerose é uma doença inflamatória crônica na qual ocorre a formação de ateromas dentro dos vasos sanguíneos. A hiperlipidemia constitui o maior fator de etiopatogenia (processo de surgimento da doença) para aterosclerose.

Elevado nível de colesterol sérico tem sido associado com o risco para doenças da artéria coronária e o desenvolvimento do infarto do miocárdio (WESLEY *et al.*, 1999). Estudos têm estabelecido que o risco de morbidade e mortalidade cardíaca está diretamente relacionado com a concentração do colesterol no plasma

(KANDEL *et al.*, 1971). Dessa forma, verificamos neste estudo que as cultivares de alho avaliadas apresentaram diferentes perfis lipídicos quando do experimento com e sem esforço físico, indicando em algumas situações fator de risco para aterosclerose.

Os dados de todos os marcadores referentes ao IAM e ao metabolismo lipídico de todos os grupos de estudo que realizaram ou não atividade física através do nado forçado estão descritos nos Anexos (2, 3, 4 e 5).

3.2.4.5 Transformação da dosagem do estudo animal para o humano

A dose diária de alho em pó liofilizada utilizada neste estudo foi de 500 mg/kg de peso do animal, considerando o fator de conversão para rato de 6 e para humano (adulto) de 37, o cálculo da DHE para o alho em pó liofilizado foi de 81,08 mg/kg, na qual equivale a dose de 4864,86 mg ou 4,86 g para uma pessoa de 60 kg. Considerando 500 mg de alho em pó liofilizado equivalente a 1400 mg de alho fresco, o valor de DHE passa a ser de 227,03 mg/kg, na qual equivale a dose de 13621,62 mg ou 13,62 g de alho fresco para uma pessoa de 60 kg.

Baseado em numerosos ensaios clínicos em humanos, a ingestão de alho cru até 10 g/dia (1 a 2 dentes de alho), ou 4-6 g de alho em pó/dia, é considerada segura quando feita em uma refeição (KOCH, 1996). Portanto, a ingestão de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano na dose de ~5 g/dia para uma pessoa de 60 kg ou o consumo de 10 g/dia de alho fresco (2 dentes de alho), conforme dados de literatura já que os valores obtidos neste estudo estão acima do especificado, podem contribuir para redução do IAM em indivíduos hiperlipidêmicos.

3.2.5 Conclusões

Ratos suplementados com extrato de alho em pó liofilizado e que realizaram atividade física exaustiva através do nado forçado (CEF) apresentaram os seguintes resultados:

- Dieta normolipídica: as cultivares Peruano (CAP), e Jinxiang (CACH) apresentaram fator de risco ao IAM, sendo a cultivar Jinxiang com maior impacto a esse fator de

risco. Para o metabolismo lipídico, ambas as cultivares apresentaram efeito anti-aterogênico.

- Dieta hiperlipídica: a cultivar Peruano (HPLP) não apresentou fator de risco ao IAM, indicando que o esforço físico atuou de forma positiva para que as dosagens bioquímicas referentes ao IAM não fossem alteradas e com relação ao metabolismo lipídico apresentou efeito anti-aterogênico. Para a cultivar Jinxiang (HPLCH) não apresentou fator de risco ao IAM, porém houve alteração elevada na dosagem de LDH, sugerindo um possível dano em outros órgãos (fígado, rins, músculos do esqueleto, células sanguíneas do cérebro ou pulmões). Com relação ao metabolismo lipídico apresentou efeito aterogênico. Portanto, a cultivar Peruano possui melhor efeito protetor para doenças cardiovasculares em condições hiperlipídicas.

Ratos suplementados com extrato de alho em pó liofilizado e que realizaram não realizaram atividade física exaustiva através do nado forçado (SEF) apresentaram os seguintes resultados:

- Dieta normolipídica: a cultivar Peruano (CAP) não atuou na redução do fator de risco ao IAM (sem alteração nas dosagens bioquímicas para o IAM), porém atuou no metabolismo lipídico como efeito anti-aterogênico. Para a cultivar Jinxiang (CACH) houve redução das dosagens bioquímicas para o IAM, possuindo desta forma um fator redutor da ação oxidativa sobre o músculo cardíaco, porém a dosagem de TGP elevada indicou um possível comprometimento hepatocelular.

- Dieta hiperlipídica: a cultivar Peruano (HPLP) atuou na redução do fator de risco ao IAM (dosagens bioquímicas reduzidas), porém atuou no metabolismo lipídico apresentando elevação nas dosagens de colesterol total e glicose. Para a cultivar Jinxiang (HPLCH) houve redução das dosagens bioquímicas para o IAM, atuando na redução do fator de risco ao IAM. No metabolismo lipídico houve elevação nas dosagens de glicose. A condição hiperlipídica aumenta o risco a doenças cardiovasculares, porém com a suplementação do alho em pó liofilizado pode colaborar na sua redução.

De acordo com os resultados apresentados, para redução do fator de risco ao IAM sugere-se consumir o alho em pó liofilizado da cultivar Peruano em condições hiperlipídicas. Como efeito preventivo a suplementação de alho não atuou na redução do IAM. O consumo aplicado neste estudo foi de 500 mg de alho em pó liofilizado/kg de massa do animal, sendo equivalente a 13,52 mg de alicina/500 mg de alho em pó liofilizado ou 1,4 g de alho cru/kg de massa do animal.

Futuras investigações devem ser conduzidas para verificar o mecanismo bioquímico envolvendo a alicina no infarto agudo do miocárdio.

3.2.6 Referências Bibliográficas

- AGARWAL, K.C. Therapeutic actions of garlic constituents. **Medicinal Research Reviews**, v.16, n.1, p.111-124, 1996.
- ALI, M.; AL-QATTAN, M.K.; AL-ENEZI, F.; KHANAFER, R.M.A; MUSTAFA, T. Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.62, n.4, p.253-259, 2000.
- AOUADI, R.; AOUIDET, A.; ELKADHI, A.; RAYANA, B.; JAAFOURA, H.; TRITAR, B.; NAGATI, K. Effect of fresh garlic (*Allium Sativum*) on lipid metabolism in male rats. **Nutrition Research**, v.20, n.2, p.273-280, 2000.
- BIRNBAUM, Y.; HALE, S.L.; KLONER, R.A. Differences in reperfusion length following 30 minutes of ischemia in the rabbit influence infarct size, as measured by triphenyltetrazolium chloride staining. **Journal of Molecular and Cellular and Cardiology**, v.29, p.657-666, 1997.
- BORDIA, A.K.; JOSHI, H.K.; SANADHYA, Y.K.; BHU, N. Effect of essential oil of garlic on serum fibrinolytic activity in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v.28, p.155-159, 1977.
- BREITHAUPT-GROGLER, K.; LING, M., BOUDOULAS, H.; BELZ, G.G. Protective effect of chronic garlic intake on elastic properties of aorta in the elderly. **Circulation**, v.96, p.2649-2655, 1997.
- CHI, M.S.; KOH, E.T.; TROY, J.S. Effects of garlic on lipid metabolism in rats fed cholesterol or lard. **Journal of Nutrition**, v.112, p.241-248, 1982.

- COLOMBO, R.C.R; AGUILLAR, O.M. Estilo de vida e fatores de risco de pacientes com primeiro episódio de infarto agudo do miocárdio. **Revista Latino-Americana de Enfermagem**, v.5, n.2, p.69-82, 1997.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Center for drug evaluation and research, Center for Biologies. Rockville, Maryland, USA. 2002.
- FREEMAN, F., KODERA, Y. Garlic chemistry: stability of S-(2-propenyl)-2-propene-1-sulfinothionate (allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.2332-2338, 1995.
- GEAC-CRF/MG – Grupo de Estudo em Análises Clínicas do Conselho Regional de Farmácia de Minas Gerais. Marcadores bioquímicos de injúria cardíaca 1. Disponível em: <<http://www.drashirleydecampos.com.br/noticias/2513>>. Acesso em: 06 maio.2009.
- GORISTEIN, S.; LEONTOWICZ, M.; LEONTOWICZ, H.; JASTRZEBSKI, Z.; DRZEWIECKI, J.; NAMIESNIK, J.; ZACHWIEJA, Z.; BARTON, H.; TASHMA, Z.; KATRICH, E.; TRAKHTENBERG, S. Dose-dependent influence of commercial garlic (*Allium sativum*) on rats fed cholesterol-containing diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4022-4027, 2006.
- HOLUB, B.J.; ARNOTT, K.; DAVIS, J-P; NAGPURKAR, A.; PESCHELL, J. Organosulfur compounds from garlic. In: **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. Washington, 2002. cap.2, p.213-279.
- ICHIKAWA, M.; NAGATOSHI, I.; KAZUHISA, O. Changes in Organosulfur Compounds in Garlic Cloves during Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4849-4854, 2006.
- ISENSEE, H.; RIETZ, B.; JACOB, R. Cardioprotective action of garlic (*Allium sativum*). **Arzneimittel-Forschung/ Drug Research**, v.38, p.94-98, 1993.
- JAIN, R. Onion and garlic in experimental cholesterol atherosclerosis in rabbits. I. Effect on serum lipids and development of atherosclerosis. **Artery**, v.1, p.115-125, 1975.

- KANAAN, S.; HORSTMANN, B. **Infarto agudo do miocárdio**. Rio de Janeiro:Rubio, 2006. 78p.
- KANNEL, W.B.; CASTELLI, W.P.; GORDON, T.; McNAMARA, P. Serum cholesterol, lipoproteins and the risk of coronary heart disease: The Framingham Study. **Annals of Internal Medicine**, v.74, p.1-2, 1971.
- KATIR, J.I.; AL-JABERI, M.M. Creatine kinase revisited. **Journal of Clinical Neuromuscular Disease**, v.2, p.158-163, 2001.
- KIELBLOCK, A.J.; MANJOO, M.; BOOYENS, J.; KATZEFF, I.E. Creatine phosphokinase and lactate dehydrogenase levels after ultra long-distance running. **South African Medical Journal**, v.55, p.1061-1064, 1979.
- KIESEWETTER, H.; JUNG, F.; JUNG, E.M.; MROWEITZ, C.; KOSCIENTLNY, J.; WENZEL, E. Effect of garlic on platelet aggregation in patients with increased risk of juvenile ischaemic attack. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.45, p.333-336, 1993.
- LABES. Laboratório Especializado Ltda. Transaminase glutâmico oxalacética (TGO). Disponível em: <<http://www.labes.com.br/FrameBoletim.htm>>. Acesso em: 01 maio 2009.
- LAU, B.; LAM, F.; WANG-CHEN, R. Effect of an odour-modified garlic preparation on blood lipids. **Nutrition Research**, v.7, p.139-149, 1987.
- LAWSON, L.D.; HUGHES, B.G. Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic. **Planta Medica**, v.58, p.345-350, 1992.
- LAWSON, L.D.; WANG, Z.J. Low allicin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of alliinase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.2592-2599, 2001.
- LAWSON, L.D.; WANG, Z-Y.J.; HUGHES, B.G. γ -Glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other *Allium* spp: Precursors of age-dependent trans-1-propenyl thiosulfinates. **Journal of Natural Products**, v.54, p.436-444, 1991.
- LICHTENSTEIN, A.H.; APPEL, L.J.; BRANDS, M.; CARNETHON, M.; DANIELS, S.; FRANCH, H.A.; FRANKLIN, B.; KRIS-ETHERTON, P.; HARRIS, W.S.; HOWARD, B.; KARANJA, N.; LEFEVRE, M.; RUDEL, L.; SACKS, F.; VAN HORN, L.; WINSTON, M.; WYLIE-ROSETT, J. Diet and Lifestyle

- Recommendations Revision 2006: A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. **Circulation**, v.114, p.82-96, 2006.
- LORGERIL, M.; SALEN, P.; MARTIN, J.L.; BOUCHER, F.; PAILLARD, F.; LEIRIS, J. Wine Drinking and risks of cardiovascular complications after recent acute myocardial infarction. **Circulation**, v.106, p.1465-1469, 2002.
- LOTT, J.A.; STANG, J.M. Serum enzymes and isoenzymes in the diagnosis and differential diagnosis of myocardial ischemia and necrosis. **Clinical Chemistry**, v.26, n.9, p.1241-1250, 1980.
- LUCAS, D.L.; BROWN, R.A.; WASSEF, M.; GILES, T.D. Alcohol and the cardiovascular system research challenges and opportunities. **Journal of American College of Cardiology**, v.45, p.1916-1924, 2005.
- MEDSPICE HEALTH PRODUCTS. Appetite, weight loss: how spices help control obesity. Disponível em: <http://www.medspice.com/content/view/89/69> . Acesso em:12 out. 2009.
- MILLAR, A.P. Serum enzyme changes in swimmers in summer training. **Australian Journal of Science and Medicine in Sport**, v.10, p.45-47, 1978.
- MIRON, T.; SHIN, I.; FEIGENBLAT, G.; WEINER, L.; MIRELMAN, D.; WILCHEK, M.; RABINKOV, A. A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. **Analytical Biochemistry**, v.307, p.76-83, 2002.
- MUKAMAL, K.J.; MACLURE, M.; MULLER, J.E.; MITTLEMAN, M.A. Binge Drinking and Mortality After Acute Myocardial Infarction. **Circulation**, v.112, p.3839-3845, 2005.
- OLIVIER, L.R.; DEWAAL, A.; RETIEF, F.J.; MARX, J.D.; KRIEL, J.R.; HUMAN, G.P.; POTGIETER, G.M. Electrocardiographic and biochemical studies on marathon runners. **South African Medical Journal**, v.53, p.783-787, 1978.
- PEIXOTO, M.S. **Fatores de risco ao infarto agudo do miocárdio em ratos submetidos à associação de etanol e/ou metilmercúrios**. 2007. 85f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.
- REAGAN-SHAW, S.; NIHAL, M.; AHMAD, N. Dose translation from animal to human studies revisited. **The FASEB Journal**, v.22, p.659-661, 2007.

- ROBERT, O.B. Practical applications of fish oil (Ω -3 Fatty Acids) in primary care. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v.18, n.1, p. 28-36, 2005.
- SAINANI, G.S.; DESAI, D.B.; GORHE, N.H.; NATU, S.M.; PISE, D.V.; SAINANI, P.G. Dietary garlic, onion and some coagulation parameters in Jain community. **Journal of Association of Physicians of India**, v.27, p.701-712, 1979.
- SAINANI, G.S.; DESAI, D.B.; GORHE, N.H.; NATU, S.M.; PISE, D.V.; SAINANI, P.G. Effect of dietary garlic and onion on serum lipid profile in Jain community. **Indian Journal of Medical Research**, v.69, p.776-780, 1979a.
- SILAGY, C.A.; NEIL, H.A.W. A meta-analysis of the effect of garlic on blood pressure. **Journal of Hypertension**, v.12, p.463-468, 1994a.
- SMITH, S.C.; JERILYN, ALLEN JR; BLAIR, S.N.; BONOW, R.O.; BRASS, L.M.; FONAROW, G.C.; GRUNDY, S.M.; HIRATZKA, L.; JONES, D.; KRUMHOLZ, H.M.; MOSCA, L.; PASTERNAK, R.C.; PEARSON, T.; PFEFFER, M.A.; TAUBERT, K.A. AHA/ACC guidelines for secondary prevention for patients with coronary and other atherosclerotic vascular disease: 2006 Update: Endorsed by the National Heart, Lung, and Blood Institute. **Journal of the American College of Cardiology**, v.47, p.2130-2139, 2006.
- SUN, H.Y.; WANG, N.P.; KERENDI, F.; HALKOS, M.; KIN, H.; GUYTON, R.A.; VINTEN-JOHANSEN, J.; ZHAO, Z.Q. Hypoxic postconditioning reduces cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺ overload. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v.288, p. H1900–H1908, 2005.
- TURNER, M. Garlic and circulatory disorder. **Journal of the Royal Society for the Promotion of Health**, v.3, p.90-93, 1990.
- VON ECKARDSTEIN, A.; SCHULTE, H.; ASSMANN, G. Increased risk of myocardial infarction in men with both hypertriglyceridemia and elevated HDL cholesterol. **Circulation**, v.99, p.1922-1926, 1999.
- WARSHAFSKY, S.; KAMER, R.S.; SIVAK, S.L. Effect of garlic on total serum cholesterol: A meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, v.119, p.599-605, 1993.

- WESLEY, G.G.; STEVEN, P.J.; NOLA, S.; TAK, Y.A.; DAVID, J.L. Effects of hypercholesterolemia on myocardial ischemia-reperfusion injury in LDL receptor deficient mice. **Atherosclerosis, Thrombosis and Vascular Biology**, v.19, p.2776, 1999.
- YANAGITA, T.; HAN, S-Y; WANG, Y-M; TSURUTA, Y.; ANNO, T. Cycloalliin, a cyclic sulfur imino acid, reduces serum triacylglycerol in rats. **Nutrition**, v.19, n.2, p.140-143, 2003.
- YANISHLIEVA-MASLAROVA, N. V.; HEINONEN, I. M. Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. In: **Antioxidants in food: practical applications**. New York. 2001, cap.10.

4. CONCLUSÃO GERAL

4.1 Estudo “in vitro”

- A caracterização físico-química e funcional do alho fresco das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang apresentou os seguintes resultados: não houve diferença significativa nos teores de umidade, sólidos solúveis, pH e teor de alicina. Houve diferença significativa no teor de acidez titulável, sendo a cultivar Peruano com maior índice; na atividade antioxidante, as cultivares Peruano e Jinxiang apresentaram menor potencial e no conteúdo de compostos fenólicos totais a cultivar Jinxiang apresentou maior conteúdo.
- O processo de liofilização causou redução significativa nos teores de alicina para a cultivar Jinxiang (91%); na atividade antioxidante para as cultivares Jinxiang (66%), Caçador (53%) e Peruano (30%) e no conteúdo de compostos fenólicos totais para as cultivares Caçador (46%) e Jinxiang (40%). O processamento não afetou os teores de alicina para as cultivares Caçador e Peruano e o conteúdo de compostos fenólicos totais para a cultivar Peruano.
- O armazenamento de bulbos de alhos frescos das cultivares Caçador, Peruano e Jinxiang por 60 dias, a $22 \pm 1^\circ\text{C}$ e $70 \pm 2\%$ U.R. mostrou que as características físico-químicas e funcionais são alteradas pelo armazenamento entre as cultivares estudadas (Caçador, Peruano e Jinxiang). Com relação às características físico-químicas houve alteração significativa quanto aos teores de acidez titulável e sólidos solúveis. Não houve alteração nos teores de umidade e pH. Para as propriedades funcionais, no teor de alicina houve redução significativa nas cultivares Peruano e Jinxiang. Não houve alteração para a cultivar Caçador. Para a atividade antioxidante, medida pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico todas as cultivares apresentaram diminuição significativa no decorrer do estudo. E quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais, todas as cultivares apresentaram aumento significativo a partir dos 30 dias de estocagem.

4.2 Estudo “in vivo”

- O modelo experimental com ratos avaliando o metabolismo lipídico (experimento sem esforço físico – SEF), mostrou que o extrato aquoso de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano reduziu os níveis de triglicerídeos e VLDL-colesterol no plasma em condições normolípídicas. A cultivar Jinxiang reduziu os níveis de triglicerídeos e VLDL-colesterol, porém aumentou significativamente os níveis de colesterol total em condições normolípídicas e os níveis de glicose em condições normo e hiperlipídicas, não sendo recomendado sua utilização como efeito protetor a saúde. Para a cultivar Peruano em condições normo e hiperlipídicas houve redução significativa no ganho de peso e ingestão diária de ração.
- O modelo experimental com ratos avaliando o infarto agudo do miocárdio – IAM (com esforço físico – CEF), mostrou que o extrato aquoso de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano reduziu o ganho de peso e a ingestão diária de ração em condições normo e hiperlipídicas, podendo ajudar na redução da obesidade. Em condições normolípídicas apresentou fator de risco ao IAM e em condições hiperlipídicas não apresentou este risco, indicando que o esforço físico atuou de forma positiva para que as dosagens bioquímicas referentes ao IAM não fossem alteradas. Para a cultivar Jinxiang em condições normolípídicas apresentou fator de risco ao IAM, com maior impacto em relação a cultivar Peruano e em condições hiperlipídicas não apresentou fator de risco ao IAM, porém houve alteração na dosagem de LDH sugerindo eventuais outros efeitos danosos.
- Conforme resultados apresentados neste estudo a ingestão de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano na dose de ~5 g/dia para uma pessoa de 60 kg ou de 10 g/dia para o alho fresco ou 2 dentes de alho/dia, pode ajudar na redução do infarto agudo do miocárdio para indivíduos hiperlipidêmicos.

4.3 Sugestões

- Uma continuidade deste trabalho seria a avaliação dos seguintes órgãos: coração, fígado, rim e pulmão;
- Aprofundamento do papel da alicina do ponto de vista bioquímico para o metabolismo lipídico e o infarto agudo do miocárdio.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS - GERAL

- ABRAMOVITZ, D.; GAVRI, S.; HARATS, D.; LEVKOVITZ, H.; MIRELMAN, D.; MIRON, T.; EILAT-ADAR, S.; RABINKOV, A.; WILCHEK, M.; ELDAR, M.; VERED, Z. Allicin-induced decrease in formation of fatty streaks (atherosclerosis) in mice fed a cholesterol-rich diet. **Coronary Artery Disease**, v.10, n.7, p.515-519, 1999.
- ACKERMANN, R.T.; MULROW, C.D.; RAMIREZ, G.; GARDNER, C.D.; MORBIDONI, L.; LAWRENCE, V.A. Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors. **Archives of Internal Medicine**, v.161, p.813-824, 2001.
- ADLER, A.J.; HOLUB, B.J. Effect of garlic and fish-oil supplementation on serum lipid and lipoprotein concentrations in hypercholesterolemic men. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.65, p.445-450, 1997.
- AGARWAL, K.C. Therapeutic actions of garlic constituents. **Medicinal Research Reviews**, v.16, n.1, p.111-124, 1996.
- AGRIBUS 2008. **Anuário da Agricultura Brasileira**. São Paulo: Instituto FNP, 2007. 502p.
- ALDER, R.; LOOKINLAND, S.; BERRY, J.A.; WILLIAMS, M. A systematic review of the effectiveness of garlic as an antihyperlipidemic agent. **Journal of the American Academy of Nurse Practitioners**, v.15, p.120-129, 2003.
- ALI, M.; AL-QATTAN, M.K.; AL-ENEZI, F.; KHANAFER, R.M.A; MUSTAFA, T. Effect of allicin from garlic powder on serum lipids and blood pressure in rats fed with a high cholesterol diet. **Prostaglandins, Leukotrienes and Essential Fatty Acids**, v.62, n.4, p.253-259, 2000.

- AMAGASE, H.; PETESCH, B.L.; MATSUURA, H.; KASUGA, S.; ITAKURA, Y. Intake of garlic and its bioactive components. **Journal of Nutrition**, v.131, p.S955-S962, 2001.
- AMIM, I., TAN, S.H. Antioxidant activity of selected seaweeds. **Malaysian Journal of Nutrition**, v.8, n.2, p. 167-177, 2002.
- ANAPA, ASSOCIAÇÃO NACIONAL DOS PRODUTORES DE ALHO. Concorrência desleal desestimula produtores de alho. Disponível em: <http://www.anapa.com.br/principal/index.php/noticias-da-anapa/642-concorrencia-desleal-desestimula-produtores-de-alho>. Acesso em: 04 abril de 2009.
- AOBA, T.; TAKAGI, H. Studies on the bulb formation in garlic plants III. On the effects of cooling treatments of seed-bulbs and day-length during the growing period on bulbing. **Journal of the Japanese Society for Horticultural Science**, v.40, p.240-245, 1971.
- APITZ-CASTRO, R.; BADIMON, J.J.; BADIMON, L.A. Garlic derivate ajoene, inhibits platelet deposition on severely damaged vessel wall in an in vivo porcine experimental model. **Thrombosis Research**, v.75, p. 243-249, 1994.
- ARNAULT, I.; HAFFNER, T.; SIESS, M.H.; VOLLMAR, A.; KAHANE, R.; AUGER, J. Analytical method for appreciation of garlic therapeutic potential and for validation of a new formulation. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.37, p.963-970, 2005.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. AOAC: **Official methods of analysis of Association of Official Analytical Chemists**.16.ed. Arlington, 1995.

- AUGUSTI, K.T.; CHACKERY, J.; JACOB, J.; KURIAKOSE, S.; GEORGE, S.; NAIR, S.S. Beneficial effects of a polar fraction of garlic (*Allium sativum* Linn) oil in rats fed with two different high fat diets. **Indian Journal of Experimental Biology**, v.43. p.76-83, 2005.
- BAGHALIAN, K.; ZIAI, S. A.; NAGHAVI, M. R.; BADI, H. N.; KHALIGHI A. Evaluation of allicin content and botanical traits in Iranian garlic (*Allium sativum* L.) ecotypes. **Scientia Horticulturae**, v.103, n.2, p.155-166, 2005.
- BANERJEE, S.K.; MAULIK, M.; GUPTA, S.K.; MANCHANDA, S.C.; DINDA, A.K.; MAULIK, S.K. Effect of chronic garlic intake on endogenous antioxidants and ischemic-reperfusion injury in isolated rat heart. **Indian Journal of Pharmacology**, v.33, p.298, 2001.
- BENKEBLIA, N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). **Food Science Technology**, v.37, p.263-268, 2004.
- BHAGYALAKSHMI, N.; THIMMARAJU, L.; VENKATACHALAM, K.N.; CHIDAMBARA MURTHY, K.N.; SREEDHAR, R.V. Nutraceutical Applications of Garlic and the Intervention of Biotechnology. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, p.607-621, 2005.
- BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.12, n.2, p.123-130, 1999.
- BIRNBAUM, Y.; HALE, S.L.; KLONER, R.A. Differences in reperfusion length following 30 minutes of ischemia in the rabbit influence infarct size, as measured by triphenyltetrazolium chloride staining. **Journal of Molecular and Cellular and Cardiology**, v.29, p.657-666, 1997.

- BORDIA, A.K.; JOSHI, H.K.; SANADHYA, Y.K.; BHU, N. Effect of essential oil of garlic on serum fibrinolytic activity in patients with coronary artery disease. **Atherosclerosis**, v.28, p.155-159, 1977.
- BRADY, J.F.; ISHIZAKI, H.; FUKUTO, J.M.; LIN, M.C.; FADEL, A.; GAPAC, J.M.; YANG, C.S. Inhibition of cytochrome P-450 2E1 by diallyl sulfide and its metabolites. **Chemical Research in Toxicology**, v.4, p.2649-2655, 1991.
- BRASIL. Instrução Normativa n.5, de 11 de dezembro de 2008. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária determina a lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado. **Diário Oficial da União**, Brasília, 12 de dez. de 2008. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/e-legis.htm>> Acesso em: 18 mar. 2009.
- BREITHAUPT-GROGLER, K.; LING, M., BOUDOULAS, H.; BELZ, G.G. Protective effect of chronic garlic intake on elastic properties of aorta in the elderly. **Circulation**, v.96, p.2649-2655, 1997.
- CANTWELL, M.I.; KANG, J.; HONG, G. Heat treatments control sprouting and rooting of garlic cloves. **Postharvest Biology and Technology**, v.30, p.57-65, 2003.
- CELLINI, L.; DI CAMPLI, E.; MASULLI, M.; DI BARTOLOMEO, S.; ALLOCATI, N. Inhibition of *Helicobacter pylori* by garlic extract (*Allium sativum*). **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.13, p.273-277, 1996.
- CHAN, H.M.; EGELAND, G.M. Fish consumption, mercury exposure, and heart diseases. **Nutrition Reviews**, v.62, p.68-72, 2004.

COHENM, L.A.; AHAO, A.; PITTMAN, B.; LUBET, R. S-allylcysteine, a garlic constituent fails to inhibit N-methylnitrosourea-induced rat mammary tumorigenesis. **Nutrition and Cancer-An International Journal**, v.35, n.1, p.58-63, 1999.

DREOSTI, I. E. Antioxidant polyphenols in tea, cocoa, and wine. **Nutrition**, v.16, n.7-8, p.692-694, 2000.

DUARTE-ALMEIDA, J.M.; SANTOS, R.J.; GENOVESE, M.I.; LAJOLA, F.M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.2, p.446-452, 2006.

EL-DEMERDASH, F.M.; YOUSEF, M.I.; ABOU EL-NAGA, N.I. Biochemical study on the hypoglycemic effects of onion and garlic alloxan-induced diabetic rats. **Food and Chemical Toxicology**, v.43, p.57-63, 2005.

ELKAYAM, A.; MIRELMAN, D.; PELEG, E.; WILCHEK, M.; MIRON, T.; RABINKOV, A.; ORON-HERMAN, M.; ROSENTHAL, T. The effects of allicin on weight in fructose-induced hyperinsulinemic, hyperlipidemic, hypertensive rats. **American Journal of Hypertension**, v.16, p.1053-1056, 2003.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Recomendações básicas para a produção de alho em pequenas propriedades. **Comunicado Técnico**. Agosto 2004, ISSN 1414-9850.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Instruções Técnicas da Embrapa Hortaliças**. Dezembro 1997, ISSN 1415-093X.

- EWALD, C.; FJELKNER-MODIG, S.; JOHANSSON, K.; SJÖHOLM, I.; AKESSON, B. Effect of processing on major flavonoids in processed onions, green beans, and peas. **Food Chemistry**, v.64, n.2, p.231-235, 1999.
- FARRET, J. F. Nutrição e doenças cardiovasculares: Prevenção primária e secundária. In: **Aplicações da nutrição em cardiologia**. São Paulo, 2005, cap.1, p. 3-7.
- FOCKE, M.; FELD, A.; LICHTENTHALER, K. Allicin, a naturally occurring antibiotic from garlic, specifically inhibits acetyl-CoA synthetase. **FEBS Letters**, v.261, p.106-108, 1990.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION. **Faostats - FAO Statistical Databases**. Disponível em: <<http://www.faostat.fao.org>> .Acesso em: 20 mar. 2009.
- FOOD AND DRUG ADMINISTRATION (FDA). Estimating the safe starting dose in clinical trials for therapeutics in adult healthy volunteers. Center for drug evaluation and research, Center for Biologies. Rockville, Maryland, USA. 2002.
- FREDRICKSON, D.S.; LEVY, R.I.; LEES, R.S. Fat transport and lipoproteins-na integrated approach to mechanisms and disorders. **New England Journal of Medicine**, v.276, p.32-35, 1967.
- FREEMAN, F., KODERA, Y. Garlic chemistry: stability of S-(2-propenyl)-2-propene-1-sulfinothionate (allicin) in blood, solvents, and simulated physiological fluids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.43, p.2332-2338, 1995.
- FUKUSHIMA, S.; TAKADA, N.; HORI, T.; WANIBUCHI, H. Câncer prevention by organosulfur compounds from garlic and onion. **Journal of Cellular Biochemistry**, v.27 (suppl.), p.100-105, 1997.

GEBHARDT, R.; BECK, H. Differential inhibitory effects of garlic-derived organosulfur compounds on cholesterol biosynthesis in primary rat hepatocyte cultures. **Lipids**, v.31, p.1269-1276, 1996.

GEBHARDT, R.; BECK, H.; WAGNER, K.G. Inhibition of cholesterol biosynthesis by allicin and ajoene in rat hepatocytes and hepG2 cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1213, p.57-62, 1994.

GORISTEIN, S.; LEONTOWICZ, M.; LEONTOWICZ, H.; JASTRZEBSKI, Z.; DRZEWIECKI, J.; NAMIESNIK, J.; ZACHWIEJA, Z.; BARTON, H.; TASHMA, Z.; KATRICH, E.; TRAKHTENBERG, S. Dose-dependent influence of commercial garlic (*Allium sativum*) on rats fed cholesterol-containing diet. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4022-4027, 2006.

GRUND, F.; GJESDAL, K.; KIRKEBOEN, K.A.; ILEBEKK, A. Duration of ischemic preconditioning and importance of size of area at risk in pigs. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, v.31, p.1369-1380, 1999.

HAIXIU, X.; RUI, S.; HONGZHOU, N.; AIGUO, C. A five-year prospective study on the relationship between garlic and gastric cancer. **Chinese Journal of Cancer Research**, v.1, p.60-62, 1989.

HAN, J.; LAWSON, L.; HAN, G.; HAN, P. A spectrophotometric method for quantitative determination of allicin and total garlic thiosulfinates. **Analytical Biochemistry**, v.225, p.157-160, 1995.

HARENBERG, J.; GIESE, C.; ZIMMERMANN, R. Effect of dried garlic on blood coagulation, fibrinolysis, platelet aggregation and serum cholesterol levels in patients with hyperlipoproteinemia. **Atherosclerosis**, v.74, p. 247-249, 1988.

HEALTH CANADA. Natural health product monograph – garlic. < <http://www.hc-sc.ca/ahc-asc/index-eng.php>>. Acesso em : 20 mar. 2009.

HERBAL CHEMISTRY. Organosulfur compounds from garlic. Avanced. Disponível em: <<http://www.herbalchem.net/GarlicAdvanced.htm>>. Acesso em: 07 jul. 2007.

HOLUB, B.J.; ARNOTT, K.; DAVIS, J-P; NAGPURKAR, A.; PESCHELL, J. Organosulfur compounds from garlic. In: **Functional Foods: Biochemical and Processing Aspects**. Washington, 2002. cap.2, p.213-279.

HU, X.; SINGH, S.V. Glutathione S-transferases of female A/J mouse lung and their induction by anticarcinogenic organosulfides from garlic. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.340, p.279-286, 1997.

HUGHES, J.; COLLIN, H.A.; TREGOVA, A.; TOMSETT, A.B.; COSSTICK, R.; JONES, M.G. Effect of low storage temperature on some of the flavour precursors in garlic (*Allium sativum*). **Plant Foods for Human Nutrition**, v.61, p.81-85, 2006.

ICHIKAWA, M.; NAGATOSHI, I.; KAZUHISA, O. Changes in Organosulfur Compounds in Garlic Cloves during Storage. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.4849-4854, 2006.

INDICADORES E DADOS BÁSICOS/ MINISTÉRIO DA SAÚDE/FUNASA/CENEPI - Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM), 2008. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sim/cnv/obtuf.def>. Acesso em: 13 fev. 2009.

- INSTITUTE FOR NUTRACEUTICAL ADVANCEMENT. Allicin Content in Garlic by HPLC (INA Method [110.001](#)). NSF INTERNATIONAL; Allicin by high-performance liquid chromatography, INA Method 110.001, 2005. Disponível em: <http://www.nsf.org/business/ina/garlic.asp>. Acesso em:15 jan. 2008.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. **Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz:** métodos químicos e físicos para análise de alimentos. 3.ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, v.1, 533p, 1985.
- ISENSEE, H.; RIETZ, B.; JACOB, R. Cardioprotective action of garlic (*Allium sativum*). **Arzneimittel-Forschung/ Drug Research**, v.38, p.94-98, 1993.
- ISMAIL, A.; MARJAN, Z.M.; FOONG, C.W. Total antioxidant activity and phenolic content in selected vegetables. **Food Chemistry**, v.87, p.581-586, 2004.
- KANAAN, S.; HORSTMANN, B. **Infarto agudo do miocárdio**. Rio de Janeiro:Rubio, 2006. 78p.
- KATSUNUMA, S. On effect of garlic on anemia. **Journal of Experimental Medicine**, v.18, p.442-444, 1932.
- KAUR, C.; KAPOOR, H.C. Anti-oxidant activity and total, phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science & Technology**, v.37, p.153-161, 2002.
- KIESEWETTER, H.; JUNG, F.; JUNG, E.M.; MROWEITZ, C.; KOSCIENTLNY, J.; WENZEL, E. Effect of garlic on platelet aggregation in patients with increased risk of juvenile ischaemic attack. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v.45, p.333-336, 1993.
- KITS, D.D. Bioactive substances in food: identification and potential uses. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.72, p.423-424, 1994.

- KLEIJEN, J.; KNIPSCHILD, P.; TERRIET, G. Garlic, onions and cardiovascular risk factors. A review of the evidence from human experiments with emphasis on commercially available preparations. **British Journal of Clinical Pharmacology**, v.28, p.535-544,1989.
- KOCH, H.P. Toxicology, side effects and unwanted effects of garlic. In: **Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species**. Baltimore, 1996. p.221-228.
- KOJURI, J.; VOSOUGHI, A.R.; AKRAMI, M. Effects of anethum graveolens and garlic on lipid profile in hyperlipidemic patients. **Lipids in Health and Disease**, v.6, p.1-5, 2007.
- KOSCIELNY, J.; KLUBEBOURD, D.; LATZA, R.; SCHMIT, R.; RADTKE, H.; SIEGEL, G.; KIESEWETTER, H. The antiatherosclerotic effect of *Allium sativum*. **Atherosclerosis**, v.144, p.237-249, 1998.
- KRIS-ETHERTON, P. M.; HECKER, K. D.; BONANOME, A.; COVAL, S. M.; BINKOSKI, A. E.; HILPERT, K. F.; GRIEL, A. E.; ETHERTON, T. D. Bioactive Compounds in Foods: Their Role in the Prevention of Cardiovascular Disease and Cancer. **American Journal of Medicine**, v.113, n.9B, p.S71-S88, 2002.
- KRIS-ETHERTON, P.M.; LEFEVRE, M.; BEECHER, G.R.; GROSS, M.D.; KEEN, C.L.; ETHERTON, T.D. Bioactive Compounds in Nutrition and Health-Research Methodologies for Establishing Biological Function: The Antioxidant and Anti-inflammatory Effects of Flavonoids on Atherosclerosis. **Annual Review of Nutrition**, v.24, p. 511-538, 2004.
- KROES, B.H. European perspective on garlic and its regulation. **Journal of Nutrition**, v.136, p.732S-735S, 2006.

- KUZUTANI, S. On effects of garlic (*Allium scorodoprasum* L.) on anemia. **Clinical Pathology and Hematology**, v.3, p.1175-1233, 1934.
- LAMM, D.L.; RIGGS, D.R. The potential application of *Allium Sativum* (garlic) for the treatment of bladder cancer. **Urologic Clinics of North America**, v.27, n.1, p.157-162, 2000.
- LANZOTTI, V. The analysis of onion and garlic. **Journal of Chromatography A**, v.1112, p.3-22, 2006.
- LAU, B.; LAM, F.; WANG-CHEN, R. Effect of an odour-modified garlic preparation on blood lipids. **Nutrition Research**, v.7, p.139-149, 1987.
- LAWSON, L.D. Effect of garlic on serum lipids. **Journal of the American Medical Association**, v.280, n.18, p.1568, 1998b.
- LAWSON, L.D. Garlic powder for hyperlipidaemia-analysis of recent negative results. **Quarterly Review of Natural Medicine**, p.188-189, 1998c.
- LAWSON, L.D. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: **Phytochemicals of Europe: chemistry and biological activity**. Washington, 1998a. n.691, p.176-209.
- LAWSON, L.D.; HUGHES, B.G. Characterization of the formation of allicin and other thiosulfinates from garlic. **Planta Medica**, v.58, p.345-350, 1992.
- LAWSON, L.D.; WANG, Z.J. Allicin and allicin-derived garlic compounds increase breath acetone through allyl methyl sulfide:use in measuring allicin bioavailability. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.1974-1983, 2005.

- LAWSON, L.D.; WANG, Z.J. Low allicin release from garlic supplements: a major problem due to the sensitivities of alliinase activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p.2592-2599, 2001.
- LAWSON, L.D.; WANG, Z-Y.J.; HUGHES, B.G. γ -Glutamyl-S-alkylcysteines in garlic and other *Allium* spp: Precursors of age-dependent trans-1-propenyl thiosulfinates. **Journal of Natural Products**, v.54, p.436-444, 1991.
- LEA, M.A.; AYYALA, U.S. Differentiating and growth inhibitory effects of diallyl disulfide on cancer cells. **International Journal of Oncology**, v.11, p.181-185, 1997.
- LEELARUNGRAYUB, N.; RATTANAPANONE, V.; CHANARAT, N.; GEBICKI, J.M. Quantitative evaluation of the antioxidant properties of garlic and shallot preparations. **Nutrition**, v.22, p.266-274, 2006.
- LI, Y.; XU S-Y.; SUN, D-W. Preparation of garlic powder with high allicin content by using microwave-vacuum and vacuum drying as well as microencapsulation. **Journal of Food Engineering**, v.83, p.76-83, 2007.
- LICHTENSTEIN, A.H.; APPEL, L.J.; BRANDS, M.; CARNETHON, M.; DANIELS, S.; FRANCH, H.A.; FRANKLIN, B.; KRIS-ETHERTON, P.; HARRIS, W.S.; HOWARD, B.; KARANJA, N.; LEFEVRE, M.; RUDEL, L.; SACKS, F.; VAN HORN, L.; WINSTON, M.; WYLIE-ROSETT, J. Diet and Lifestyle Recommendations Revision 2006: A Scientific Statement From the American Heart Association Nutrition Committee. **Circulation**, v.114, p.82-96, 2006.
- LIU, J.; MILNER, J. Influence of dietary garlic powder with and without selenium supplementation on mammary carcinogen adducts. **FASEB Journal**, v.4, p.A1117, 1990.

- LORGERIL, M.; SALEN, P.; MARTIN, J.L.; BOUCHER, F.; PAILLARD, F.; LEIRIS, J.
Wine Drinking and risks of cardiovascular complications after recent acute myocardial infarction. **Circulation**, v.106, p.1465-1469, 2002.
- LUCAS, D.L.; BROWN, R.A.; WASSEF, M.; GILES, T.D. Alcohol and the cardiovascular system research challenges and opportunities. **Journal of American College of Cardiology**, v.45, p.1916-1924, 2005.
- MILNER, J.A. Garlic: its anticarcinogenic and antitumorigenic properties. **Nutrition Reviews**, v.54, p.S82-S86, 1996.
- MIRON, T.; BERCOVICI, T.; RABINKOV, A.; WILCHEK, M.; MIRELMAN, D. [H] Allicin: preparation and applications. **Analytical Biochemistry**, v.331, 364-369, 2004.
- MIRON, T.; SHIN, I.; FEIGENBLAT, G.; WEINER, L.; MIRELMAN, D.; WILCHEK, M.; RABINKOV, A. A spectrophotometric assay for allicin, alliin, and alliinase (alliin lyase) with a chromogenic thiol: reaction of 4-mercaptopyridine with thiosulfinates. **Analytical Biochemistry**, v.307, p.76-83, 2002.
- MORAES, F.P.; COLLA, L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, n.2, p.109-122, 2006.
- MORETTI, C.L.; SARGENT, S.A.; HUBER, D.J.; CALBO, A.G.; PUSCHMANN, R. Chemical composition and physical properties of pericarp, locule and placental tissues of tomatoes with internal bruising. **Journal of the American Society for Horticultural Science**, v.123, n.4, p.656-660, 1998.

- MOTA, J.H.; NOCE, R.; YURI, J.E.; RESENDE, G.M.; SOUZA, R.J. Análise da evolução da produção e relação risco-retorno da cultura do alho, no Brasil e regiões (1991 e 2000). **Horticultura Brasileira**, v.23, n.2., p.238-241, 2005.
- MUKAMAL, K.J.; MACLURE, M.; MULLER, J.E.; MITTLEMAN, M.A. Binge Drinking and Mortality After Acute Myocardial Infarction. **Circulation**, v.112, p.3839-3845, 2005.
- NAGAE, S.; USHIJIMA, M.; HATONO, S.; IMAEL, J.; KASUGA, S.; MATSUURA, H.; ITAKURA, I.; HIGASHI, Y. Pharmacokinetics of the garlic compound S-allylcysteine. **Planta Medica**, v.60, p.214-217, 1994.
- NAKAGAWA, S.; MASAMOTO, K.; SUMIYOSHI, H.; KUNIHIRO, K.; FUWA, T. Effect of raw garlic juice and aged garlic extract on growth of young rats and their organs after peroral administration. **Journal of Toxicological Sciences**, v.5, p.91-112, 1980.
- NAMIKI, M. Antioxidant/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.29, p.273-300, 1990.
- NATIONAL ACADEMY PRESS. Dietary Reference Intakes for vitamin C, vitamin E, selenium, and carotenoids. Washington: National Academy Press, 2000.
- NUUTILA, A.M.; PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AARNI, M.; OKSMAN-CALDENTY, K-M. Comparison of antioxidant activities of onion and garlic extracts by inhibition of lipid peroxidation and radical scavenging activity. **Food Chemistry**, v.82, p.485-493, 2003.
- O'GARA, E.A.; HILL, D.J.; MASLIN, D.J. Activities of garlic oil, garlic powder and their diallyl constituents against *Helicobacter pylori*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.5, p.2269-2273, 2000.

- OKADA, Y.; TANAKA, K.; SATO, E.; OKAJIMA, H. Kinetic and mechanistic studies of allicin as an antioxidant. **Organic and Biomolecular Chemistry**, v.4, p.4113-4117, 2006.
- OLIVEIRA, C.M.; SOUZA, R.J.; MOTA, J.H.; YURI, J.E.; RESENDE, G.M. Determinação do ponto de colheita na produção de alho. **Horticultura Brasileira**, v.21, n.3, p.506-509, 2003.
- OLIVEIRA, C.M.; SOUZA, R.J.; YURI, J.E.; MOTA, J.H.; RESENDE, G.M. Época de colheita e potencial de armazenamento em cultivares de alho **Horticultura Brasileira**, v.22, n.4, p.804-807, 2004.
- PEIXOTO, M.S. **Fatores de risco ao infarto agudo do miocárdio em ratos submetidos à associação de etanol e/ou metilmercúrios**. 2007. 85f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Belém, 2007.
- PHELPS, S.; HARRIS, W. Garlic supplementation and lipoprotein oxidation susceptibility. **Lipids**, v.28, p.475-477, 1993.
- PINTO, J.T.; QIAO, C.; XING, J.; RIVLIN, R.S.; PROTOMASTRO, M.L.; WEISSLER, M.L.; TAO, Y.; THALER, H.; HESTON, W.D. Effects of garlic thioallyl derivatives on growth, glutathione concentration, and polyamine formation of human prostate carcinoma cells in culture. **American Journal of Clinical Nutrition**, v.66, p.398-405, 1997.
- POLLONIO, M.A.R. Alimentos funcionais: as recentes tendências e os aspectos de segurança envolvidos no consumo. **Revista Higiene Alimentar**, v.14, n.74, p.26-31, 2000.

- QUEIROZ, Y.S. **Alho (*Allium sativum*) e produtos: atividade antioxidante *in vitro* durante a vida de prateleira**. 2006. 128f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.
- RAHMAN, K.; LOWE, G.M. Garlic and cardiovascular disease: a critical review. **Journal of Nutrition**, v.136, p.736S-740S, 2006.
- REEVES, P.G.; NIELSEN, F.H.; FAHEY Jr., G.C. 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. **American Institute of Nutrition**, p.1939-1951, 1993.
- REUTER, H.D.; KOCH, H.P.; LAWSON, L.D. Therapeutic effects and applications of garlic and its preparations. In: **Garlic: the science and therapeutic application of *Allium sativum* L. and related species**. Baltimore, 1996. p. 135-212.
- REUTER, H.D.; SENDL, A. *Allium sativum* and *Allium ursinum*: chemistry, pharmacology and medicinal applications. **Economic and Medicinal Plant Research**, v.6, p.56-113, 1994.
- RIETZ, B.; BELAGYI, J.; TOROK, B.; JACOB, R. The radical scavenging ability of garlic examined in various models. **Bollettino Chimico Farmaceutico**, v.134, p.69-76, 1995.
- RIGGS, D.R.; DEHAVEN, J.I.; LAMM, D.L. *Allium sativum* (garlic) treatment for murine transitional cell carcinoma. **Cancer**, v.79, p.1987-1994, 1997.
- ROBERT, O.B. Practical applications of fish oil (Ω -3 Fatty Acids) in primary care. **Journal of the American Board of Family Medicine**, v.18, n.1, p. 28-36, 2005.

- SAKAMOTO, K.; LAWSON, L.D.; MILNER, J.A. Allyl sulfides from garlic suppress the *in vitro* proliferation of human 549 lung tumor cells. **Nutrition and Cancer**, v.29, p.152-156, 1997.
- SANCE, M.M.; BAUZÁ, M.; CAMARGO, A.B.; GONZÁLEZ, R.E.; SOTO, V.E. Evaluation of the Argentinean garlic germplasm in relation to its aptitude for the freeze drying process. **Molecular Medicinal Chemistry**, v.10, p.33-34, 2006.
- SCHAFFER, J.T.; LIU, J.Z.; GREEN, J.; DANGLER, C.A.; MILNER, J.A. Garlic and associated allyl sulfur components inhibit *N-metyl-N-nitroso*urea-induced rat mammary carcinogenesis. **Cancer Letters**, v.102, p.199-204, 1996.
- SHOBAHALAN, H.; ARUMUGAM, R. Chemical changes in the quality parameters of garlic during growth and development. **South Indian Horticulture**, v.39, n.2, p.93, 1991.
- SIGOUNAS, G.; HOOKER, J.; ANAGNOSTOU, A.; STEINER, M. S-Allilmercaptocysteine inhibits cell proliferation and reduces the viability of erythroleukemia, breast, and prostate cancer cell line. **Nutrition and Cancer**, v.27, p.186-191, 1997.
- SILAGY, C.A.; NEIL, H.A. Garlic as a lipid lowering agent – a meta-analysis. **Journal of the Royal College of Physicians of London**, v.28, p.39-45, 1994.
- SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.

- SIRVAM, G.P.; LAMPE, J.W.; ULNESS, B.; SWANZY, S.R.; POTTER, J.D.
Helicobacter pylori – in vitro susceptibility to garlic (*Allium sativum*) extract.
Nutrition and Cancer, v.27, p.118-121, 1997.
- SOARES-COSTA, J.T.S. Nova definição clínica do enfarte do miocárdio. **Medicina Interna**, v.12, n.1, p. 37-41, 2005.
- SROKA, Z. The screening analysis of antiradical activity of some plant extracts.
Postepy Hig Med Dosw, v.60, p.563-570, 2006.
- STRINGHETA, P.C.; OLIVEIRA, T.T.; GOMES, R.C.; AMARAL, M.P.H.;
CARVALHO, A.F.; VILELA, M.A.P. Políticas de saúde e alegações de
propriedades funcionais e de saúde para alimentos no Brasil. **Revista
Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.43, n.2, p.181-194
- SUN, H.Y.; WANG, N.P.; KERENDI, F.; HALKOS, M.; KIN, H.; GUYTON, R.A.;
VINTEN-JOHANSEN, J.; ZHAO, Z.Q. Hypoxic postconditioning reduces
cardiomyocyte loss by inhibiting ROS generation and intracellular Ca²⁺
overload. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory
Physiology**, v.288, p. H1900–H1908, 2005.
- TABELA BRASILEIRA DE COMPOSIÇÃO DE ALIMENTOS – Alho cru, 2008.
Disponível em: <<http://www.fcf.usp.br/tabela>>. Acesso em: 09 março 2009.
- TAKAGI, H. Studies on bulb formation and dormancy of garlic plants. **Bulletin of the
Yamagata University Agricultural Science**, v.8, p.507-599, 1979.
- TAPIERO, H.; TOWNSEND, D.M.; TEW, K.D. Organosulfur compounds from
alliaceae in the prevention of human pathologies. **Biomedicine and
Pharmacotherapy**, v.58, p.183-193, 2004.

- TATTELMAN, E. Health effects of garlic. **American Family Physician**, v.72, p.103-106, 2005.
- TEPE, B.; SOKMEN, M.; AKPULAT, H.A.; SOKMEN, A. In vitro antioxidant activities of the methanol extracts of five *Allium* species from Turkey. **Food Chemistry**, v.92, p.89-92, 2005.
- TURNER, M. Garlic and circulatory disorder. **Journal of the Royal Society for the Promotion of Health**, v.3, p.90-93, 1990.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE (USDA, 2008). **National Nutrient Database for Standard Reference. Release 21. Garlic. Food group:Vegetables & Veg products.** Disponível em: [<www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>](http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/). Acesso em:23 mar. 2009.
- VOLK, G.M.; ROTINDO, K.E.; LYON, W. Low-temperature storage of garlic for spring planting. **Horticultural Science**, v.39, p.571-573, 2004.
- VON ECKARDSTEIN, A.; SCHULTE, H.; ASSMANN, G. Increased risk of myocardial infarction in men with both hypertriglyceridemia and elevated HDL cholesterol. **Circulation**, v.99, p.1922-1926, 1999.
- WARSHAFSKY, S.; KAMER, R.S.; SIVAK, S.L. Effect of garlic on total serum cholesterol: A meta-analysis. **Annals of Internal Medicine**, v.119, p.599-605, 1993.
- WEISBERGER, A.S.; PENSKY, J. Tumor inhibition by a sulfhydryl-blocking agent related to an active principle of garlic (*Allium sativum*). **Cancer Research**, v.18, p.1301-1308, 1958.

YANAGITA, T.; HAN, S-Y; WANG, Y-M; TSURUTA, Y.; ANNO, T. Cycloalliin, a cyclic sulfur imino acid, reduces serum triacylglycerol in rats. **Nutrition**, v.19, n.2, p.140-143, 2003.

YANISHLIEVA-MASLAROVA, N. V.; HEINONEN, I. M. Sources of natural antioxidants: vegetables, fruits, herbs, spices and teas. In: **Antioxidants in food: practical applications**. New York. 2001, cap.10.

YEH, Y.Y.; LIU, L. Cholesterol-lowering effects of garlic extracts and organosulfur compounds: human and animal studies. **Journal of Nutrition**, v.131, p. 989S-993S, 2001.

YEH, Y.Y.; YEH, S.M. Garlic reduces plasma lipids by inhibiting hepatic cholesterol and triacylglycerol synthesis. **Lipids**, v.29, p.189-193, 1994.

YIN, M.C.; CHENG, W.S. Antioxidant activity of several *Allium* members. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.4097-4101, 1998b.

YIN, M.C.; CHENG, W.S. Inhibition of *Aspergillus niger* and *Aspergillus flavus* by some herbs and spices. **Journal of Food Protection**, v.61, p.123-125, 1998a.

YOU, W.C.; BLOT, W.J.; CHANG, Y.S.; ERSHOW, A.; YANG, Z.T. Allium vegetables and reduced risk of stomach cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v.81, p.162-164, 1989.

6. ANEXOS

6.1 ANEXO 1 – Certificado de aprovação do Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA).

 <p>Universidade de Brasília Instituto de Ciências Biológicas Comitê de Ética no Uso Animal</p>
<p>Brasília, 26 de agosto de 2008.</p>
<p style="text-align: center;">DECLARAÇÃO</p>
<p>Declaramos que o projeto intitulado "PROPRIEDADES FUNCIONAIS "IN VITRO" E "IN VIVO" DE ALHOS FRESCOS E PROCESSADOS", UNBDOC nº 18914/2008, sob responsabilidade do Prof. Celso Luiz Moretti, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.</p>
<p style="text-align: right;"> Prof. Antonio Sebben Coordenador do CEUA</p>

6.2 ANEXO 2 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas referentes ao infarto agudo do miocárdio no grupo de estudo dos animais que não realizaram esforço físico através do nado forçado (SEF=sem esforço físico).

Grupos de estudo	CK (U/L)	CK-MB (U/L)	LDH (U/L)	TGO (U/L)	TGP (U/L)
Controle	663,80 ± 35,94	801,20 ± 46,69	961,67 ± 115,97	80,50 ± 3,41	26,30 ± 2,75
CAP	566,00 ± 80,00	716,40 ± 92,85	823,67 ± 92,50	75,30 ± 6,50	26,30 ± 0,58
CACH	453,70 ± 36,36	561,60 ± 28,40	850,67 ± 138,28	78,30 ± 11,38	42,30 ± 4,11
HPLC	1169,00 ± 129,15	1475,00 ± 123,86	1267,67 ± 214,41	93,50 ± 6,14	34,00 ± 3,16
HPLP	860,70 ± 104,30	1209,10 ± 74,49	660,67 ± 158,37	87,50 ± 7,05	31,50 ± 3,70
HPLCH	725,30 ± 74,22	942,00 ± 57,99	827,67 ± 91,11	83,30 ± 6,65	38,80 ± 2,50

Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Valores representados por média ± d.p. (média ± desvio padrão).

6.3 ANEXO 3 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas referentes ao metabolismo lipídico no grupo de estudo dos animais que não realizaram esforço físico através do nado forçado (SEF=sem esforço físico).

Grupos de estudo	Colesterol Total (mmol/L)	HDL-Colesterol (mmol/L)	VLDL-Colesterol (mmol/L)	Triglicerídeos (mmol/L)	Glicose (mmol/L)
Controle	1,46 ± 0,01	0,64 ± 0,01	0,65 ± 0,02	3,23 ± 0,10	10,75 ± 0,86
CAP	1,53 ± 0,09	0,66 ± 0,03	0,42 ± 0,03	2,10 ± 0,13	10,23 ± 1,03
CACH	1,83 ± 0,10	0,68 ± 0,06	0,40 ± 0,03	1,99 ± 0,17	12,00 ± 0,13
HPLC	2,30 ± 0,12	0,56 ± 0,06	0,37 ± 0,02	1,88 ± 0,11	8,30 ± 0,61
HPLP	2,41 ± 0,05	0,65 ± 0,04	0,37 ± 0,003	1,86 ± 0,02	13,23 ± 0,61
HPLCH	2,32 ± 0,03	0,62 ± 0,02	0,37 ± 0,02	1,86 ± 0,08	13,71 ± 1,14

Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Valores representados por média ± d.p. (média ± desvio padrão).

6.4 ANEXO 4 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas referentes ao infarto agudo do miocárdio no grupo de estudo dos animais que realizaram esforço físico através do nado forçado (CEF=com esforço físico).

Grupos de estudo	CK (U/L)	CK-MB (U/L)	LDH (U/L)	TGO (U/L)	TGP (U/L)
Controle	517,00 ± 13,11	582,27 ± 10,42	581,00 ± 112,58	65,50 ± 3,51	16,00 ± 0,82
CAP	792,00 ± 81,71	900,50 ± 72,24	620,00 ± 77,25	73,00 ± 7,21	18,33 ± 3,05
CACH	809,33 ± 109,04	1178,33 ± 86,44	664,20 ± 70,93	94,25 ± 3,09	23,33 ± 1,53
HPLC	482,00 ± 75,48	557,00 ± 86,56	403,67 ± 86,03	65,25 ± 2,99	28,67 ± 1,15
HPLP	532,00 ± 93,79	599,03 ± 79,54	521,67 ± 9,50	66,00 ± 6,98	24,33 ± 3,21
HPLCH	455,00 ± 8,89	562,77 ± 68,87	881,00 ± 95,79	60,75 ± 5,91	31,33 ± 4,04

Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Valores representados por média ± d.p. (média ± desvio padrão).

6.5 ANEXO 5 – Valores das concentrações das dosagens bioquímicas referentes ao metabolismo lipídico no grupo de estudo dos animais que realizaram esforço físico através do nado forçado (CEF=com esforço físico).

Grupos de estudo	Colesterol Total (mmol/L)	HDL-Colesterol (mmol/L)	VLDL-Colesterol (mmol/L)	Triglicerídeos (mmol/L)	Glicose (mmol/L)
Controle	1,93 ± 0,17	0,81 ± 0,06	0,51 ± 0,05	3,13 ± 0,34	14,53 ± 0,73
CAP	1,84 ± 0,04	0,74 ± 0,06	0,59 ± 0,06	1,71 ± 0,20	8,23 ± 0,75
CACH	1,80 ± 0,09	0,76 ± 0,08	0,50 ± 0,05	2,47 ± 0,25	11,99 ± 0,49
HPLC	4,07 ± 0,25	0,53 ± 0,08	0,31 ± 0,01	1,71 ± 0,27	12,58 ± 0,17
HPLP	3,60 ± 0,16	0,65 ± 0,06	0,29 ± 0,04	1,34 ± 0,05	17,77 ± 0,90
HPLCH	4,87 ± 0,16	0,66 ± 0,05	0,22 ± 0,006	1,10 ± 0,03	14,15 ± 1,32

Controle (dieta controle normolipídica); CAP (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano); CACH (dieta normolipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang); HPLC (dieta controle hiperlipídica); HPLP (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Peruano) e HPLCH (dieta hiperlipídica acrescida de alho em pó liofilizado da cultivar Jinxiang). Valores representados por média ± d.p. (média ± desvio padrão).

