



**VNiVERSiDAD
D SALAMANCA**
CAMPUS DE EXCELENCIA INTERNACIONAL

Caracterização química e propriedades bioativas de *Allium sativum* L. com diferentes proveniências e processamentos

Joana Catarina Silva Botas

*Dissertação apresentada ao Instituto Politécnico de Bragança
e à Universidade de Salamanca para obtenção do
Grau de Mestre em Farmácia e Química de Produtos Naturais*

Orientado por

Ana Maria Carvalho

Isabel C.F.R. Ferreira

Lillian Barros

Bragança

Outubro de 2017

Agradecimentos

Às minhas orientadoras, Doutora Ana Maria Carvalho, Doutora Isabel C.F.R. Ferreira e Lillian Barros, por todo o apoio que me deram desde o primeiro dia. Pela disponibilidade que sempre demonstraram quando as procurei, não só em relação à Tese mas para qualquer outro assunto ou projeto que lhes colocasse. Foram incansáveis e sem elas não teria sido possível realizar este trabalho.

À Doutora Ângela Fernandes, que me recebeu de braços abertos no laboratório muito antes de terminar a minha licenciatura e me mostrou na prática o que é ser uma Cientista. Por tudo o que me ensinou sobre o trabalho laboratorial. Por toda a simpatia, dedicação e paciência... Sem o seu apoio e a sua ajuda não teria sido possível concluir este trabalho. Sinto-me uma sortuda por ter tido a oportunidade de trabalhar com alguém com tantas qualidades científicas e humanas.

A toda a equipa do BioChemCore pela simpatia e disponibilidade por me ajudar em todas as etapas deste trabalho. Foi um prazer ter tido a oportunidade de trabalhar com uma equipa de tamanha qualidade e que me proporcionaram um excelente ambiente de trabalho.

À Professora Anabela Martins e à equipa do GIAPE por, em primeiro lugar me terem proporcionado uma magnífica experiência enquanto aluna do programa “Verão Ciência”. Antes dessa experiência nunca teria sonhado vir a ser aluna do IPB. Em segundo lugar, pela simpatia que sempre me demonstraram e por todos os bons momentos que me proporcionaram nas colaborações que fiz com o GIAPE.

Aos meus colegas de licenciatura, em particular à Cíntia, ao Jonas, à Carolina, ao Daniel, ao João, à Maria, à Daniela, e tantos outros... Por serem os amigos que são e por juntos termos trilhado esse percurso de descoberta e de conquista numa etapa tão importante das nossas vidas. Pelas conversas, pelas noitadas e por todos os outros momentos que tornaram inesquecível a vida académica de Bragança. Sem vocês esta cidade não é a mesma, mas estou certa de que os laços que criámos nunca se perderam, independentemente da distância.

À Lisa e à Liliana, que se incluem no parágrafo anterior e com quem partilhei uma das experiências mais extraordinárias da minha vida. O intercâmbio no México. Foi algo que me marcou muito e continuará a marcar a minha vida. Foram 5 meses, vividos ao

máximo e que me trouxeram aprendizagens incomparáveis. Sem vocês, essa experiência não teria sido tão espetacular quanto foi.

Aos meus colegas de Mestrado pelas experiências partilhadas quer em Bragança quer em Salamanca. Foi muito bom ter-vos conhecido. Em especial à Ingride, à Catarina e à Célia, com quem tive o privilégio de partilhar casa e momentos inesquecíveis.

A todos os professores que durante o meu percurso me deram as ferramentas para que pudesse chegar até aqui. À minha professora da primária, Claudemira; à professora Berta Dinis, a quem devo os meus conhecimentos de inglês; à professora Teresa Pereira, que me despertou o gosto pelas Plantas Aromáticas e Medicinais; às minhas professoras do Teatro: Amélia, Cristina e Edite, que mais do que ensinamentos artísticos, me deram a sua amizade e me ensinaram a ser uma pessoa melhor.

Às minhas pinguins, Lúcia e Sara. Não é fácil arranjar palavras para descrever tudo o que são para mim e muito menos descrever todo o apoio e amizade que me dão. Bragança juntou-nos e não tenho dúvidas de que sem esse encontro a minha vida não seria a mesma. Apesar da distância sei que estão sempre lá para os desabafos, para os conselhos... E havemos de arranjar sempre forma de nos voltar a encontrar e de monopolizar as conversas. Obrigada pela vossa amizade.

Aos meus camaradas, por tudo o que me ensinaram e continuam a ensinar e que contribuíram profundamente para a pessoa que sou hoje. Pelo exemplo de resistência, perseverança e coragem, que procuro honrar.

A todos os outros amigos que não referi mas que são uma parte importante da minha vida.

Por fim, aos meus pais, pela educação que me deram e por sempre me terem dado a liberdade de fazer as minhas próprias escolhas, em todos os aspetos da minha vida. Por todos os esforços e sacrifícios que fizeram para eu poder alcançar os meus objetivos e cumprir os meus sonhos.

A todos o meu Muito Obrigada!

Índice geral

Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	ix
Abreviaturas.....	xiii
Resumo	xv
1. Introdução.....	19
1.1. <i>Allium sativum</i> L. e os seus usos medicinais	19
1.2. Composição química de <i>A. sativum</i>	22
1.3. Novos produtos à base de <i>A. sativum</i>	28
1.3.1. <i>Técnicas de envelhecimento</i>	28
1.3.2. <i>Técnicas de fermentação</i>	29
1.3.3. <i>Tratamento térmico</i>	30
2. Objetivos.....	33
3. Material e métodos	35
3.1. Amostras	35
3.2. Padrões e reagentes	35
3.3. Determinação do valor nutricional e dos compostos hidrofílicos.....	36
3.3.1. <i>Valor nutricional e energético</i>	36
3.3.2. <i>Açúcares livres</i>	36
3.3.3. <i>Ácidos orgânicos</i>	37
3.4. Compostos Lipofílicos	37
3.4.1. <i>Ácidos gordos</i>	37

3.4.2. Tocoferóis.....	38
3.5. Avaliação das propriedades bioativas.....	39
3.5.1. Preparação dos extratos e considerações gerais.....	39
3.5.2. Atividade antioxidante.....	39
3.5.2.1. Atividade bloqueadora de radicais DPPH.....	39
3.5.2.2. Poder Redutor.....	40
3.5.2.3. Inibição da descoloração do β -caroteno/linoleato.....	40
3.5.2.4. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	41
3.5.3. Atividade antimicrobiana.....	42
3.6. Análise estatística.....	42
4. Resultados.....	43
4.1. Valor nutricional e compostos hidrofílicos.....	43
5. Conclusão.....	51
6. Bibliografia.....	55
Material Suplementar.....	lxi

Lista de Figuras

Figura 1. Representação botânica de <i>A. sativum</i>	19
Figura 2 - Síntese dos principais compostos presentes em <i>A. sativum</i>	24
Figura 3. Alterações na cor do alho preto ao longo do estudo de Choi et al., 2014.....	32

Lista de Tabelas

Tabela 1. Valor nutricional e compostos hidrofílicos de <i>A. sativum</i>	45
Tabela 2. Composição química em compostos lipofílicos de <i>A. sativum</i>	47
Tabela 3. Propriedades antioxidantes das diferentes amostras de <i>A. sativum</i>	48
Tabela 4. Atividade antimicrobiana de amostras distintas de <i>A. sativum</i>	50

Material suplementar

Tabela 1. Perfil de resistência de bactérias Gram positivas e Gram negativas a diferentes antibióticos; valores de CMI ($\mu\text{g/mL}$)..... lxi

Abreviaturas

ANOVA - Análise de variância

AOAC - Associação Oficial de Químicos Analistas

BG - alho preto

BHT - Butil-hidroxitolueno (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol)

CA - Califórnia

CG - amostra de alho comercial proveniente de Espanha

CMB - concentração mínima bactericida

CMI - concentração mínima inibitória

DAD - detetor de díodos

DADS - dialil dissulfeto

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo

EC₅₀ - concentrações de extrato que fornecem 50% da atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância

EUA – Estados Unidos da América

FAME - mistura de ésteres metílicos de ácidos gordos

FAO - Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura

FID - detetor de ionização de chama

fw - massa fresca

GC - cromatografia gasosa

HPLC- cromatografia líquida de alta eficiência

INT - cloreto de iodonitrotetrazólico

LC- cromatografia líquida

MA – Massachusetts

MDA - complexo malondialdeído

MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina

MS - espectrometria de massa

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à metilicina

MUFA - ácidos gordos monoinsaturados

PA - Pensilvânia

PI - padrão interno

PUFA - ácidos gordos polinsaturados

RI - detetor de índice de refração

RSA - atividade captadora de radicais livres

RSS - espécie reativa de enxofre

SD - desvio padrão

SFA - ácidos gordos saturados

TBA – ácido tiobarbitúrico

TGA - amostra de agricultura tradicional proveniente do Algarve

TBARS - inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico

TGTM - amostra de agricultura tradicional de Trás-os-Montes

Tris - 2-amino-2-(hidroximetil) propano-1,3-diol

UFLC - cromatografia líquida ultra rápida

v/v - Relação volume/volume

Resumo

O alho (*Allium sativum* L.) é utilizado em todo o mundo não só pelo seu interesse dietético mas também pelo seu interesse nutricional, na profilaxia e tratamento de diversas patologias. O alho apresenta um interessante perfil nutricional bem como compostos bioativos, responsáveis pelas suas propriedades biológicas, nomeadamente propriedades antioxidantes, antimicrobianas, imunoestimuladoras, hipoglicémicas, entre outras.

O presente trabalho tem como objetivo estudar os bolbilhos (dentes) de alho cultivado submetidos a diferente processamento (alho branco e alho preto) e de diferentes proveniências (área geográfica e sistema de agricultura).

Todas as amostras foram estudadas relativamente ao seu perfil nutricional e à sua composição química (valor nutricional e energético, compostos hidrofílicos e lipofílicos) e igualmente quanto às suas propriedades bioativas (atividade antioxidante e antimicrobiana).

Nutricionalmente a amostra de alho preto apresentou menor percentagem de humidade (54 %), maior teor em açúcares totais (33,55 g/100 g fw) e valor energético (176,63 Kcal/100 g fw). Os resultados das amostras de alho branco não apresentaram diferenças significativas entre si, tendo-se destacado a amostra comercial. A amostra de alho preto apresentou resultados significativamente diferentes quando comparada com as amostras de alho branco.

As amostras de alho preto apresentaram resultados bastante satisfatórios no que se refere à atividade anitmicrobiana, com especial destaque contra *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina.

O estudo da composição química dos alimentos que compõem a nossa dieta e do impacto que estes têm no nosso organismo é de extrema importância. Nos últimos anos novas técnicas de processamento têm sido desenvolvidas e colocadas no mercado, com o objetivo de melhorar o sabor e o valor nutricional dos alimentos. Nos alimentos com propriedades bioativas reconhecidas é igualmente importante analisar se essas técnicas influenciam alterações nas suas características físico-químicas.

Abstract

Garlic (*Allium sativum* L.) has been used worldwide not only for its dietary interest, but also for its medicinal purposes, in prophylaxis and for the treatment of a diverse of pathologies. Garlic presents an interesting nutritional profile as well as bioactive compounds, responsible for its biological properties, namely, antioxidant, antimicrobial, immunostimulatory, hypoglycemic, among others.

The present work aimed to study bulbils (cloves) of cultivated garlic submitted to different processes (white and black garlic) and from different origins and type of farming system.

All samples were studied regarding their nutritional and chemical composition (nutritional and energetic value, hydrophilic and lipophilic compounds), as well as their bioactive properties (antioxidant and antimicrobial activity).

Regarding the nutritional composition, black garlic presented the lowest moisture content (54%), higher total sugars (33.55 g/100 g fw) and energetic value (176.63 Kcal/100 g fw). The white garlic sample did not reveal significant differences between all samples, thus being highlighted the commercial sample.

Black garlic samples presented satisfactory results regarding antimicrobial activity, with especially against methicillin resistant *S. aureus*.

The study of the chemical composition of the foods that make up our diet and the impact they stimulate in our body is extremely important. New processing techniques have been developed and placed on the market in recent years to improve the organoleptic and nutritional value of food products. Moreover, for foods with recognized bioactive properties, it is also equally important to analyze whether these techniques influence changes in their characteristics.

1. Introdução

1.1. *Allium sativum* L. e os seus usos medicinais

Allium sativum L. é uma planta herbácea bulbosa, com folhas lineares, flores brancas ou avermelhadas e que pode atingir até 70 cm de altura (Figura 1). O seu bulbo encontra-se protegido no solo (geófito) e é composto por um conjunto de bolbilhos oblongo-aguçados, comumente denominados de dentes de alho (Cunha et al., 2009). Os seus bolbilhos não possuem pecíolo (sésseis) e estão cobertos por túnicas externas (peças de proteção) de cor branca ou rosada. Atualmente está incluída na família *Amaryllidaceae* (The Plant List) e foi registada por Linnaeus em 1753 (International Plant Names Index).



Figura 1. Representação botânica de *A. sativum*. Coccygodynious (2012).

Acredita-se que o alho seja originário da Ásia central e ocidental (Cunha et al., 2006). Atualmente apresenta uma ampla distribuição geográfica, com uma área de cultivo de 1 547 381 ha e uma produção de 24 939 965 toneladas, segundo dados FAO publicados em 2014 (FAO, 2014).

Desde a antiguidade que o alho (*A. sativum* L.) é utilizado pelas populações quer pelo seu interesse gastronómico, como condimento, quer pelas propriedades medicinais que lhe são atribuídas.

O registo mais antigo conhecido do alho remonta a uma pintura rupestre, datada de 3000 A.C. Encontra-se também referido num papiro egípcio, de 1600 A.C., o qual

reporta que os trabalhadores que construíram as pirâmides realizaram uma greve para reivindicar um aumento da quantidade de alho e cebola (outra planta do género *Allium*) que lhes era destinada (Fintelmann et al., 2010).

Quanto às suas propriedades medicinais, o alho foi mencionado no famoso Papiro de Ebers, no papiro mágico grego e foi igualmente descrito por Hipócrates para o tratamento da pneumonia e de feridas, no seu *Corpus Hippocraticum*. O alho está igualmente ligado a diversas superstições dizendo-se que é um excelente repelente de vampiros e um antídoto para dentadas de cão, sendo mais recentemente usado pelas parteiras gregas para afastar o “olho do diabo” das salas de parto (Borlinghaus et al., 2014).

A parte mais utilizada são os bolbilhos (denominados dentes de alho), no entanto em culinária também se utilizam as suas folhas frescas (Martins et al., 2016). O alho apresenta um sabor e aroma bastante característicos que derivam da hidrólise de alguns dos seus componentes (Cunha et al., 2009).

No que respeita às suas propriedades medicinais, o alho é descrito como tendo propriedades antimicrobianas, antissépticas, antifúngicas, antivirais, antioxidantes, anticancerígenas, imunoestimuladoras, cardioprotetoras e hipoglicémicas (Cunha et al., 2006, 2009; Fintelmann et al., 2010; Ried, et al., 2016; Zhou et al., 2016). Estas propriedades estão relacionadas com os seus compostos bioativos, em especial os compostos organossulfurados (Martins et al., 2016).

Desde há décadas que são conduzidos estudos *in vitro* e *in vivo* que confirmam e validam as propriedades que são atribuídas ao alho. De acordo com Lee et al. (2009), a utilização de alho apresentou potencial hipoglicémico quando incluído na dieta de ratos com *Diabetes mellitus* tipo 2. Também pela sua atividade antioxidante pode prevenir/minimizar complicações desta patologia (Lee et al., 2009; Ha et al., 2015).

Os compostos sulfurados, principalmente os hidrossolúveis, são os principais responsáveis pela diminuição da agregação plaquetária e pelo aumento da atividade fibrinolítica. Já as frutanas são os compostos responsáveis pela ação diurética do alho (Cunha et al., 2009).

Acredita-se que a alicina, um dos compostos bioativos do alho, seja a principal responsável pelas suas propriedades medicinais. A alicina é fisiologicamente ativa em células microbianas, vegetais e em mamíferos e pode levar à inibição da proliferação de bactérias e fungos de modo definitivo. Além disso em linhas celulares de mamíferos, incluindo células cancerígenas, a alicina induz morte celular e inibe a proliferação

celular. A alicina apresenta uma variedade de propriedades promotoras da saúde, por exemplo, diminuição dos níveis de colesterol e de pressão arterial (efeitos que são vantajosos para o sistema cardiovascular) (Borlinghaus et al., 2014).

Apesar de, no geral, o alho ser benéfico para a saúde também pode apresentar alguns efeitos adversos. Esses efeitos não passam apenas pelo odor que fica impregnado no corpo e que pode resultar em mau-hálito; em doses excessivas, pode causar reações alérgicas, problemas estomacais e diarreia (Amagase et al., 2001; Borlinghaus et al., 2014).

Um estudo recente comparou óleos essenciais de *A. sativum* L. obtidos com diferentes solventes quanto à sua composição química e atividade microbiana. Foram testadas amostras de alho branco e alho roxo, sendo que o último apresentou um teor bastante superior de óleo essencial. A sua composição química era idêntica diferindo no teor de cada componente, o que se poderá dever à sua diversidade genética e origem geográfica (El-sayed et al., 2016).

A necessidade de desenvolver trabalhos sobre a conservação e exploração da diversidade de cultivos tradicionais, locais e comerciais é uma componente essencial da agricultura sustentável. As variedades tradicionais estão intimamente associadas com os usos, conhecimentos e hábitos que os agricultores desenvolveram ao longo do tempo e querem manter. A generalização da agricultura moderna, intensiva e industrializada tem conduzido à substituição das variedades tradicionais de muitas culturas, levando a uma grande perda de biodiversidade (Buhk et al., 2017).

No entanto, no caso de alimentos de grande consumo, como é o caso do alho, torna-se praticamente inevitável a utilização de culturas intensivas sendo bastante comum a utilização de adubos. Altas concentrações de azoto, na forma de sulfato de amónio e de ureia resultam no aumento do conteúdo de ácido pirúvico e na acumulação de nitrato nos tecidos das plantas. Por outro lado, a fertilização com enxofre está possivelmente ligada ao conteúdo de aliina nos bolbilhos de alho, enquanto que um aumento da taxa de azoto pode não significar um aumento no teor de aliina (Martins et al., 2016).

Beato et al. (2011) testaram a influência do local de cultivo e do genótipo na composição química do alho. Para tal, estudaram 10 variedades de *A. sativum* (de alho-branco, alho-roxo e alho chinês) cultivadas em quatro localizações distintas. A localização não afetou significativamente o teor de fenóis totais, mas o mesmo não se verificou para o genótipo, para o qual se registou uma variação nos resultados. O fator

que mais influenciou o conteúdo em ácidos fenólicos foi a interação localização/genótipo.

O alho encontra-se disponível para consumo, não só no seu estado natural, mas também noutras formas de formulações, de acordo com as técnicas de processamento aplicadas. Entre essas formulações estão os extratos, o óleo essencial, as pilulas, as cápsulas e o alho em pó. No entanto, a composição química e o teor em compostos bioativos variam consideravelmente de formulação para formulação (Lanzotti et al., 2014; Ha et al., 2015).

Exemplo disso são algumas discrepâncias nos resultados de alguns estudos realizados com óleo e alho em pó, que demonstraram não ter qualquer efeito na redução do nível de lípidos e de glicémia no sangue, ao contrário do que aconteceu com o alho fresco (Ha et al., 2015).

O alho em pó tem vindo a demonstrar um comportamento inferior ao alho fresco em relação a vários parâmetros, nomeadamente na sua capacidade antimicrobiana contra algumas estirpes microbianas (Martins et al., 2016).

1.2. Composição química de *A. sativum*

O alho é rico em compostos sulfóxidos, entre os quais podemos encontrar aliinas (sulfóxidos de alquicisteína) e aminoácidos não voláteis (tiosulfinais), aos quais se devem as propriedades medicinais que lhe são reconhecidas (Martins et al., 2016; Cunha et al., 2009). É composto ainda por frutanas (cerca de 75%), açúcares redutores (15%) compostos tiocianídicos (tiosulfinais de alilo e outros derivados alílicos), sais minerais, saponinas e vestígios de vitaminas (A, complexo B e C) (Cunha et al., 2009).

As propriedades medicinais do alho estão relacionadas com os seus compostos bioativos, especialmente os compostos organossulfurados que são igualmente responsáveis pelo seu sabor e aroma. Por outro lado, estes compostos podem aumentar a biossíntese de glutatona, com reconhecidas propriedades antioxidantes. Entre os compostos responsáveis pelo seu sabor estão os aminoácidos não voláteis (tiosulfinais), nomeadamente aliina ou sulfóxido de S-alicisteína (Martins et al., 2016).

Outros compostos voláteis significativos são os ajoenes bem como diversos compostos sulfurados para além da aliina, como a alicina, 1,2 – vinilditina, alixina e S-

alilcisteína. Contém ainda sulfidos como dialil-, metilalil- e dipropil mono-, di-, tri- e tetra-sulfidos que são formados a partir da decomposição de tiosulfinatos.

A natureza volátil destes compostos bioativos está altamente envolvida nos mecanismos de defesa da planta contra pragas e agentes patogénicos, uma vez que a sua libertação ocorre em resposta a danos celulares e lesões nos tecidos das plantas. Os compostos organossulfurados do alho mais característicos e mais voláteis são libertados após destruição da membrana celular por uma reação enzimática que causa a α -, β -eliminação da aliina e de outros sulfóxidos (Borlinghaus et al., 2014; Martins et al., 2016).

O precursor da alicina é um aminoácido não proteico, a aliina (sulfóxido S-alilcisteína). Sendo um tiosulfinato, a alicina é uma espécie reativa de enxofre (RSS) e passa por reações redox com grupos tiol presentes na glutatona e em proteínas, reações essas que são essenciais para a sua bioatividade. A aliina e outros sulfóxidos S-alquil-L-cisteína (localizados no citoplasma) são hidrolisados pela enzima aliinase (localizada no vacúolo) e, no caso da aliina, esta reação leva à produção de desidroalanina e de ácido alilsulfúrico. A partir de uma molécula de alicina condensam-se espontaneamente duas moléculas de ácido alil-sulfúrico (Borlinghaus et al., 2014).

O substrato de aliina pode ser extraído a partir de bolbilhos de alho ou sintetizado a partir da cisteína por alquilação seguida de oxidação. Como a alicina apresenta uma alta reatividade e uma baixa estabilidade térmica é difícil de obter e armazenar alicina pura sem contaminação por compostos relacionados nomeadamente, ajoene, vinilditiina ou polissulfano. No entanto, soluções aquosas armazenadas a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ demonstraram ser estáveis durante alguns anos (Borlinghaus et al., 2014).

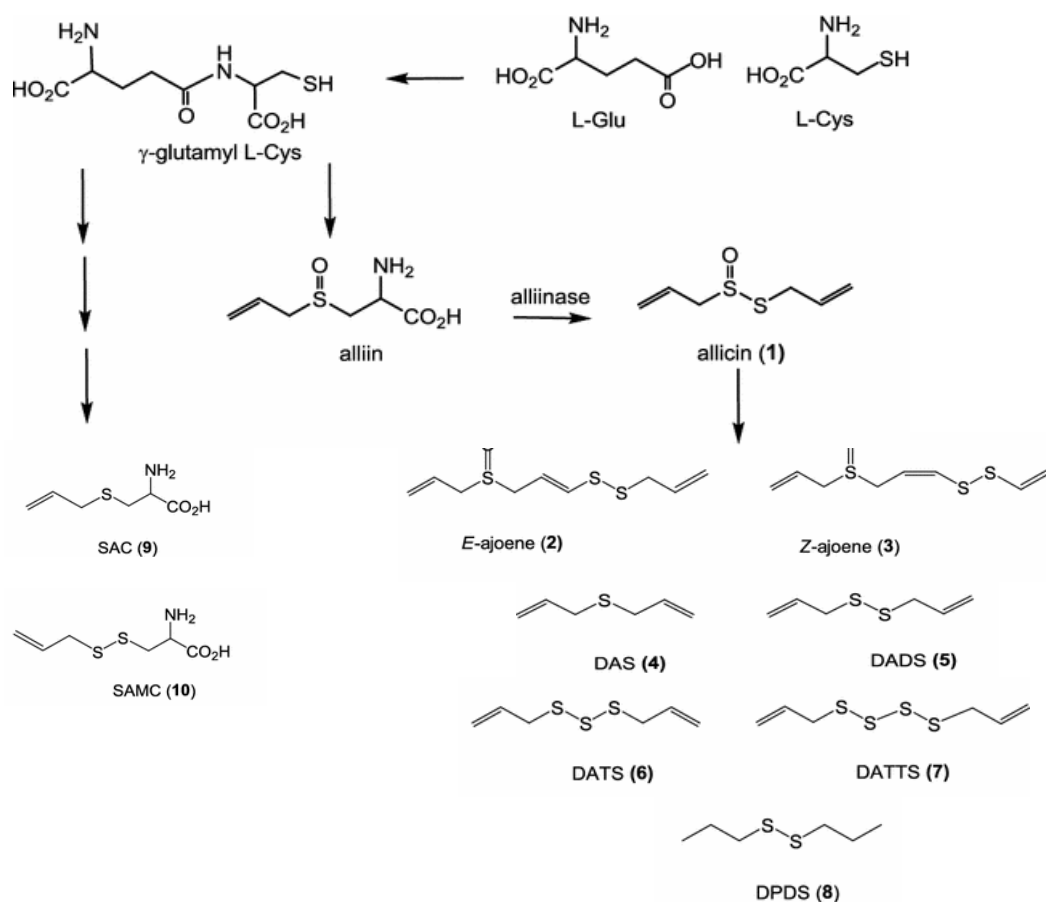


Figura 2 - Síntese dos principais compostos presentes em *A. sativum* (Adaptado de Lanzotti et al., 2014).

O ajoene é um dos principais componentes identificados em extratos alcoólicos de bolbo de alho e apresenta atividade antiagregante plaquetária, sendo capaz de potenciar a prostaciclina. Para além disso inibe a ativação das plaquetas, a união das mesmas à parede de vasos sanguíneos danificados e a formação de trombos. A sua atividade antiagregante está associada à inibição da via da lipoxigenase e da tirosina fosfatase plaquetárias (Navarro, 2007).

Para além dos compostos voláteis, o alho poderá conter vitaminas (especialmente vitaminas do complexo B e vitamina C) e é rico em antioxidantes (em especial a quercetina e a alicina), e minerais (especialmente P, K e Se), sendo igualmente considerado uma fonte rica noutros fitonutrientes não voláteis com importantes propriedades medicinais e terapêuticas, com principal ênfase para os flavonóides, saponinas e sapogeninas, óxidos de compostos fenólicos azotados, amidas e proteínas. Péptidos como o c-glutamyl-s-2-propenil-cisteína (GluAlc), c-glutamyl-s-

trans-1-propenil-cisteína e c-glutamil-s-metil-cisteína são importantes intermediários metabólicos da biossíntese do sulfóxido de S-alilcisteína e são também considerados reservas celulares de azoto e enxofre.

O alho foi classificado em segundo lugar numa lista de 23 vegetais consumidos regularmente, no que diz respeito ao conteúdo em fenóis totais (Vinson et al., 1998). Outros estudos têm ido de encontro a esses resultados, sugerindo-o como uma das mais ricas fontes de compostos fenólicos totais e estando muito bem classificado no que diz respeito ao consumo per capita de fenóis na dieta humana (Lanzotti et al., 2014).

No entanto, existe uma grande variabilidade no conteúdo de fenóis totais observado, não só nos vários genótipos e ecótipos, mas também de acordo com as técnicas de cultivo aplicadas e as condições de crescimento. Outros indicadores de qualidade relacionados com a composição química, nomeadamente sólidos solúveis totais, pH e glúcidos, apresentam também uma grande variabilidade entre os genótipos, independentemente das condições de crescimento (Martins et al., 2016).

O processamento também pode influenciar a composição química (Ramirez et al., 2016). Por exemplo, cozinhar o alho a 100 °C durante 40 e 60 min diminuiu o conteúdo em fenóis totais, como demonstrou Jastrzebski et al. (2007).

Segundo Borlinghaus et al. (2014), a atividade antimicrobiana do alho é atribuída quase exclusivamente à alicina. O facto de o dialil dissulfeto (DADS) (figura 2), um dos produtos diretos da decomposição da alicina, ter uma atividade antimicrobiana significativamente baixa indica que o grupo tiosulfinato tem um importante papel nesta atividade (uma vez que se perde na redução da alicina para DADS). Os derivados de tiosulfinato diferem nos grupos alquilo que estão acoplados ao grupo tiosulfinato, tanto no comprimento da cadeia como nas ramificações. A ramificação de grupos alquilo resulta numa diminuição da atividade. O tiosulfinato mais eficaz é o n-pentil-tiosulfinato, ligeiramente mais eficaz e muito mais estável que a alicina devido à ausência de ligações duplas. O efeito bacteriostático de tiosulfinatos contra bactérias Gram positivo torna-se mais forte com o aumento da cadeia de carbonos, mas mais fraco para bactérias Gram negativo.

A eficácia de antibióticos convencionais, tais como β -lactâmicos ou glicósidos, é comparável à alicina. No entanto, a alicina é ativa contra um espetro mais amplo do que a maioria dos antibióticos disponíveis, sendo ativa tanto contra bactérias Gram positivo como contra Gram negativo.

A alicina demonstrou ser eficaz contra os agentes patogénicos resistentes a determinados antibióticos. Um caso a realçar é o *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA), o principal causador de infeções hospitalares, devido à sua multirresistência à maioria dos antibióticos disponíveis. A alicina tem vindo a demonstrar um potencial inibitório contra essa estirpe (Borlinghaus et al, 2014).

Na maioria dos estudos têm-se utilizando extratos de alho em detrimento de alicina pura. Em geral, a atividade antimicrobiana do alho está diretamente relacionada com o conteúdo de alicina sendo que nos extratos nos quais a sua atividade é inibida durante a extração, o extrato perde a sua capacidade antimicrobiana. No entanto, um estudo demonstrou que os extratos de alho contendo alicina são duas vezes mais eficazes que a própria alicina sintética, na inibição de *Staphylococcus aureus*. Isto indica que a alicina atua sinergicamente com outros compostos presentes no alho (Fujisawa et al., 2009).

Chegou-se também à conclusão de que os princípios ativos presentes no alho, responsáveis pela sua atividade antibacteriana, assim como alguns antibióticos de origem sintética, reagem com a cisteína, não estando demonstrada a razão para essa reação, mas acreditando-se que se deve a uma inibição enzimática. O pré-tratamento destes antibióticos com cisteína leva à perda total da sua atividade (Borlinghaus et al., 2014).

Apesar de quimicamente a alicina ser um oxidante, em doses baixas atua como antioxidante ao nível fisiológico. Um exemplo da oxidação de um fator de transcrição redox-sensível é o sistema Nrf2/keap1 que regula a expressão de várias enzimas antioxidantes, tendo vários estudos demonstrado a capacidade da alicina induzir este sistema. A sua ativação pela alicina é importante não só no contexto de doenças cardiovasculares, mas também para outros problemas de saúde como doenças neurodegenerativas. A alicina demonstra igualmente a capacidade de suprimir a biossíntese de colesterol, facto atribuído à inibição da esqualeno-monooxigenase e de enzimas acetil-CoA sintase (Borlinghaus et al., 2014).

A alicina atua ainda como anti-hipertensor o que se deve mais uma vez à sua reatividade. Como a alicina se decompõe rapidamente nos seus produtos de degradação, demonstrou-se que uma complexa reação de cascata com tióis (em particular a glutatona) resulta na libertação de sulfeto de hidrogénio, molécula gasosa sinalizadora da regulação da pressão sanguínea. O sulfeto de hidrogénio diminui a pressão arterial

por relaxamento das células da musculatura lisa dos vasos sanguíneos que se expande e resulta na diminuição da pressão (Borlinghaus et al., 2014).

No que toca aos compostos fenólicos são vários os estudos que os identificaram em extratos de alho. Entre os compostos identificados encontram-se: ácidos fenólicos (*e.g.* ácido cafeíco, ferúlico, *p*-cumárico, gálico e clorogénico); flavan-3-ols (*e.g.* derivados de catequina e epicatequina); flavonas (*e.g.* apigenina e luteolina), flavanonas (*e.g.* naringenina) e flavonóis (*e.g.* derivados de quercetina) (Fратиanni et al., 2016; Kallel et al., 2014).

Li et al. (2015) efetuaram um estudo onde inibiram a formação dos compostos voláteis sulfurados que se formam durante o processamento do alho. Como resultado dessa inibição conseguiram identificar cinco novos compostos fenólicos presentes no alho, bem como nove compostos já conhecidos. As cinco novas flavonas identificadas foram: diosmetina (8-(3-metil-(E)-1-butenil), crisina (8-(3-metil-(E)-1-butenil), crisina (6-(3-metil-(E)-1-butenil) e aliumonas A e B.

A identificação destes compostos pode contribuir para a compreensão da influência dos compostos fenólicos na formação enzimática e não enzimática dos compostos sulfurados (Li et al., 2015).

Fратиanni et al. (2016) estudaram diferentes variedades italianas de alho e verificaram que apesar de alguns dos compostos fenólicos estarem presentes em todas as variedades (como o ácido gálico, clorogénico e Isotiocianato de alila) a concentração era distinta entre elas.

A casca de alho, um bio-resíduo, é uma fonte ainda pouco explorada quanto às suas potencialidades nutricionais e medicinais. No entanto os desperdícios alimentares começam a ser encarados com possível interesse agroindustrial. Um estudo efetuado em casca de alho, por Kallel et al. (2014), verificaram que este bio-resíduo continha um alto teor proteico, apreciáveis níveis de magnésio, potássio e cálcio. A casca de alho revelou ainda um alto teor em fibra e em lignina, sendo esta constituída por diferentes grupos funcionais que incluem grupos hidroxilo alifáticos, grupos carboxilo e grupos fenólicos.

Nesse estudo foram identificados 14 polifenóis com especial relevância para o ácido hidroxibenzóico, o ácido *p*-cumárico, ácido cumaroilquinico e o glucósido de ácido *p*-cumárico (Kallel et al., 2014).

1.3. Novos produtos à base de *A. sativum*

Apesar das suas propriedades reconhecidas, muitos consumidores evitam a utilização de alho fresco. Esta opção prende-se com o facto de associarem o alho a um aroma forte (devido aos compostos organossulfurados) que permanece no corpo e pode originar mau hálito. Além disso, o alho também tem sido associado a irritação gástrica (Heber, 1997).

Nesse sentido, existe uma preocupação em encontrar e colocar novos produtos no mercado que resultem da eliminação do aroma desagradável e da melhoria do paladar. Com esse objetivo, têm sido aplicados novos tipos de processamento nomeadamente, envelhecimento, fermentação e tratamento térmico.

1.3.1. Técnicas de envelhecimento

Os extratos de alho envelhecido obtêm-se através de uma extração prolongada (até 20 meses) de bolbos de alho fresco. Vários estudos têm demonstrado que o alho envelhecido não só mantém as propriedades do alho fresco (imunomoduladoras, hepatoprotetoras e protetoras a nível cardiovascular) como apresenta uma melhor capacidade antioxidante (Borek, 2001).

Está também descrito que uma extração prolongada de alho fresco com uma solução hidroalcoólica à temperatura ambiente, origina um extrato menos irritante e sem aroma. Durante a extração existe uma modificação dos compostos organossulfurados do alho em compostos solúveis, nomeadamente a s-alilcisteína (tornando-os mais estáveis) (Wang, 2015).

Nencini et al. (2011) testaram extratos hidroetanólicos a 15% de uma amostra de *A. sativum* e de outras três espécies espontâneas de *Allium* quanto ao seu potencial antioxidante e ao conteúdo em fenóis totais. Neste estudo, o conteúdo em fenóis totais foi superior no extrato envelhecido de alho, em comparação com o alho fresco. Além disso concluíram que o extrato envelhecido de folhas de *A. sativum* apresentou uma maior atividade antioxidante que o extrato obtido a partir dos bolbos.

Estes resultados poderiam sugerir que a capacidade antioxidante se possa dever não só aos compostos organossulfurados mas também a outro tipo de compostos como alcaloides, formados durante o processo de envelhecimento e que poderão ser mais abundantes nas folhas do que nos bolbos (Nencini et al., 2011).

1.3.2. Técnicas de fermentação

Os alimentos fermentados são produzidos através da utilização de culturas iniciais de microrganismos e as condições de fermentação são importantes para prevenir atividade bacteriana prejudicial, sabores intensos e outros efeitos indesejáveis. Estão disponíveis no mercado variados produtos que contêm bolbilhos de alho descascados fermentados, com ou sem adição de outras especiarias. O alho fermentado poderá proteger diabéticos, através dos seus efeitos antioxidantes (Jung et al., 2014). A fermentação pode fornecer uma série de vantagens adicionais, como um enriquecimento do sabor e de metabolitos desejáveis produzidos pelos microrganismos.

O conteúdo em compostos organossulfurados no alho descascado em conserva, fermentado a partir de uma cultura de *Lactobacillus pentosus*, é alterado durante o processamento e armazenamento. Em particular, após a fermentação com culturas de *L. pentosus*, o alho apresentou uma diminuição dos compostos sulfurados bioativos, em comparação com o alho fresco esmagado (Beato et al., 2012).

Montaño et al. (2004) estudaram as alterações na composição química (conteúdo em açúcares, ácido láctico e vitamina C), durante a fermentação espontânea de alho descascado em salmoura. No entanto, entre as desvantagens deste tipo de fermentação encontra-se uma diminuição do ácido ascórbico. O alho é fermentado por bactérias lácticas, enquanto que na fermentação de outros alimentos se utilizam fungos, como bolores e leveduras como culturas iniciais.

Em particular, *Saccharomyces cerevisiae* é um tipo de levedura utilizada na fermentação do vinho e de milho. O fungo *Monascus* sp. tem sido utilizado para produzir alimentos orientais fermentados, em estudos académicos e na indústria devido à sua capacidade para produzir diversos compostos biologicamente ativos; *Mimulus pilosus* é um exemplo especialmente proeminente devido à utilização alargada dos seus produtos de fermentação (Montaño et al., 2004).

Em conjunto, estes estudos sugerem que os compostos organossulfurados utilizados no alho são afetados por diferentes condições de fermentação e pode ser um importante fator no controlo de qualidade e na avaliação dos produtos de alho fermentado. No entanto, muitas culturas iniciais ainda não foram estudadas durante o processo de fermentação de alho descascado.

Assim sendo, Kim et al. (2016) propuseram-se validar métodos analíticos para determinar 11 tipos de compostos organossulfurados em alho descascado, utilizando o LC-MS.

Além disso, foram avaliadas as alterações na composição de compostos organossulfurados no alho, durante o processo de fermentação. A fermentação do alho foi induzida por culturas iniciais de três estirpes microbianas: *S. cerevisiae*, *M. pilosus* e *Lactobacillus plantarum*. O conteúdo no péptido c-glutamil diminuiu significativamente, mas o conteúdo correspondente em S-alq(en)il-L-cisteína aumentou drasticamente durante a fermentação.

Os resultados indicaram que o conteúdo em S-alilcisteína pode ser incrementado mais eficazmente utilizando *M. pilosus* em relação às outras estirpes. A maior quantidade de cicloaliina foi obtida quando se utilizou *S. cerevisiae*. Estes resultados podem ser úteis para os produtores de alho decidirem em relação às várias estirpes microbianas (Kim et al., 2016).

1.3.3. Tratamento térmico

O tratamento térmico é o método de processamento mais utilizado para remover o sabor e odor desagradáveis de alho. Quando os bolbos de alho são submetidos a tratamento térmico, ocorrem várias alterações físico-químicas, incluindo alterações no sabor, cor e teor de nutrientes. O produto resultante é conhecido como alho preto e é assim denominado precisamente devido à alteração da cor dos bolbilhos (Angeles et al., 2016)

Os bolbos de alho fresco são colocados inteiros no escuro, em condições controladas de temperatura e humidade durante cerca de um mês. Este tratamento térmico leva a reações não enzimáticas de escurecimento tais como a reação de Maillard, a caramelização e a oxidação química de fenóis. Muitas reações não enzimáticas de escurecimento estão associadas à formação de compostos com fortes propriedades antioxidantes (Manzoco et al., 2001).

O alho preto apresenta um aroma menos intenso que o alho fresco e um sabor adocicado, que se deve à transformação da alicina em compostos antioxidantes solúveis em água, tais como S-alilcisteína, tetra-hidro- β -carbolinas, alcaloides biologicamente ativos e flavonoides. A S-alilcisteína é formada no catabolismo de γ -glutamilcisteína e inibe o estado de oxidação relacionado com o envelhecimento e várias doenças

crônicas. Foram também identificados derivados de tetra-hidro- β -carbolina, formados pela condensação entre triptofano e aldeído, à semelhança do que ocorre na produção de ácido pirúvico pela via aliina-alicina das reações de Maillard (Bae, 2014).

Vários estudos atestam que o alho preto, à semelhança do alho fresco, apresenta benefícios para a saúde, devido às suas propriedades antioxidantes, antidiabéticas, anti-inflamatórias, hipocolesterolêmicas, hipolipidêmicas e antitumorais (Bae et al., 2014). Estes estudos têm demonstrado uma maior atividade antioxidante do que o alho fresco e uma maior eficácia para a prevenção de doenças metabólicas e hepatotoxicidade alcoólica.

Jeong et al. (2016), compararam a atividade antioxidante e anti-inflamatória de uma amostra de alho fresco com outra de alho-negro. Nesse estudo constataram que, apesar do alho preto apresentar uma capacidade antioxidante superior, o mesmo não se verificou quanto à atividade anti-inflamatória.

Ao administrar alho preto a ratos numa dieta rica em lípidos, o nível de glucose no sangue diminui significativamente assim como a insulina. Além disso, o nível de lípidos e de colesterol diminuiu significativamente. Comparando com estudos idênticos realizados com alho fresco, o alho preto teve o mesmo efeito com uma concentração bastante inferior (2% para o alho fresco e 0,5% para o alho preto) (Ha et al., 2015). A produção de alho preto ainda não se encontra estandardizada, sendo que cada produtor pode aplicar diferentes condições de temperatura e humidade, bem como diferentes durações de tratamento.

Para avaliar quais as condições ótimas para a produção de alho preto, têm sido desenvolvidos vários estudos. Esses estudos procuram igualmente perceber as alterações químicas e organolépticas que ocorrem durante o processo e a influência de cada um dos parâmetros referidos para essas alterações. Têm sido testadas diferentes temperaturas (40, 55, 70 e 85 °C) ao longo de 45 dias.

Neste período, o conteúdo em humidade diminuiu, para todas as temperaturas. Para as temperaturas mais altas o pH diminuiu de forma mais significativa e a intensidade da cor aumentou (figura 3) (Bae et al, 2014; Choi et al., 2014; Liang et al., 2015). O conteúdo em S-alilcisteína aumentou mais para temperaturas mais baixas.

Por outro lado, a atividade antioxidante, baseada nos ensaios de DPPH (2,2,-difetil-1-picril-hidrazilo) e de poder redutor, aumentou mais para temperaturas mais altas, acompanhando o aumento de compostos de escurecimento, de S-alilcisteína, fenóis totais e flavonoides totais (Bae et al., 2014). Outros estudos revelaram ainda um

aumento no conteúdo de ácidos (Choi et al., 2014), em especial ácido acético (Liang et al., 2015).

Como seria de esperar, o conteúdo em alicina diminuiu drasticamente, dando origem a outros compostos (Liang et al., 2015).

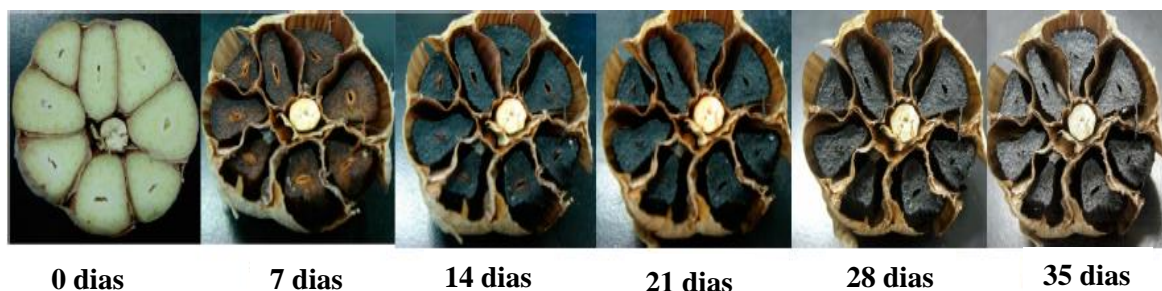


Figura 3. Alterações na cor do alho preto ao longo do estudo de Choi et al., 2014.

Os autores Choi et al. (2014) sugeriram como condições ótimas para a produção de alho preto a temperatura de 70 °C e 90 % de humidade relativa, durante 21 dias. Até ao 21º dia, o conteúdo em humidade, os açúcares redutores e a acidez total aumentaram significativamente. Os conteúdos de fenóis e flavonoides totais aumentaram significativamente até esse dia, mantendo-se praticamente inalterados após esse período e a atividade antioxidante foi consistente com a variação dos compostos antioxidantes (Choi et al., 2014).

2. Objetivos

O presente trabalho tem por objetivo geral caracterizar diferentes amostras de *A. sativum* de diferentes proveniências e dois tipos de processamento: alho-branco fresco (não processado) e alho-negro (submetido a tratamento térmico). O tratamento térmico tem por objetivo melhorar as características organoléticas do alho. Ao comparar as amostras, pretende-se perceber se o processamento influencia positivamente as características nutricionais e bioativas do alho, como sugerido pela bibliografia.

Assim, este trabalho teve como principais objetivos:

I. Caracterizar quimicamente as amostras de alho no que concerne à sua composição em macronutrientes e compostos individuais hidrofílicos e lipofílicos.

a) Determinação de macronutrientes (humidade, gordura, proteínas, glúcidos e valor energético) segundo protocolos oficiais de análise de alimentos.

b) Análise de açúcares por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI).

c) Análise de ácidos orgânicos por HPLC acoplada a um detetor de fotódodos (HPLC-DAD).

d) Análise de ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada a um detetor de ionização de chama (GC-FID).

e) Análise de tocoferóis por HPLC acoplada a um detetor de fluorescência (HPLC-Fluorescência).

II. Avaliar as propriedades bioativas das amostras de alho

a) Avaliação da atividade antioxidante pelo efeito captador de radicais livres, poder redutor e inibição da peroxidação lipídica em homogeneizados cerebrais (ensaios *in vitro*).

b) Avaliação da atividade antimicrobiana efetuados por ensaios *in vitro* utilizando o método da microdiluição, com o corante INT (cloreto de iodonitrotetrazólico) para o cálculo da concentração mínima inibitória - CMI

3. Material e métodos

3.1. Amostras

As amostras de alho cultivado (*Allium sativum* L.) ensaiadas são provenientes de:

(i) Sistemas de tradicional e foram adquiridas em 2015, diretamente aos produtores em mercados locais em Bragança (Trás-os-Montes) e Silves (Algarve). Correspondem a variedades não identificadas do tipo alho-branco, mantidas pelo agricultor;

(ii) Sistemas de agricultura intensiva e adquiridos em 2015 numa grande superfície comercial, sendo oriundos do sul de Espanha. Variedade desconhecida do tipo alho-branco;

(iii) Processamento por tratamento térmico, amostras de alho-negro fornecidas diretamente por uma empresa Espanhola. Variedade e tipo desconhecidos.

Todas as amostras foram previamente liofilizadas (FreeZone 4.5, Labconco, MO, EUA), reduzidas a pó (20 mesh) e conservadas a -20 °C para análise posterior.

3.2. Padrões e reagentes

Os solventes acetonitrilo 99,9%, *n*-hexano 95% e acetato de etilo 99,8%, de grau HPLC foram adquiridos na Lab-Scan (Lisboa, Portugal). O metanol e os restantes reagentes químicos de grau analítico foram obtidos a partir de fontes comuns. A mistura padrão com 37 ésteres metílicos de ácidos gordos (FAME) (referência 47885-U) foi adquirida na Sigma (St. Louis, MO, EUA), bem como os padrões de açúcares e ácidos orgânicos e o Trolox (ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-carboxílico). A solução de Tocol racémico e o padrão de tocoferóis foram adquiridos na Matreya (Pleasant Gap, PA, EUA). O 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH) foi obtido na Alfa Aesar (Ward Hill, MA, EUA). O corante cloreto de *p*-iodonitrotetrazólico (INT) foi adquirido na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA) e utilizado como indicador do crescimento microbiano. A água foi tratada recorrendo a um sistema de purificação Milli-Q (TGI Pure Water Systems, Greenville, Carolina do Sul, EUA).

3.3. Determinação do valor nutricional e dos compostos hidrofílicos

3.3.1. Valor nutricional e energético

Foi avaliada a composição em macronutrientes (cinzas, proteínas, lípidos e glúcidos), a humidade e o valor energético seguindo os métodos oficiais de análise de alimentos (AOAC, 2016). O teor de proteínas totais foi estimado pelo método macro-Kjeldahl por conversão do azoto total utilizando o fator de correção ($N \times 6,25$). A gordura total foi determinada após extração de uma massa conhecida da amostra com éter de petróleo, utilizando o aparelho de Soxhlet. As cinzas foram determinadas por incineração numa mufla a 600 ± 15 °C. Os glúcidos foram calculados por diferença e a energia foi calculada de acordo com a seguinte equação: Energia (Kcal) = $4 \times (\text{g proteínas} + \text{g glúcidos}) + 9 \times (\text{g lípidos})$.

3.3.2. Açúcares livres

Os açúcares livres foram determinados por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detetor de índice de refração (HPLC-RI), seguindo o protocolo de extração e análise previamente descrito pelos autores (Grangeia, Heleno, Barros, Martins, & Ferreira, 2011). Às amostras liofilizadas (1 g) foi adicionado 1 mL de padrão interno (melezitose, 5 mg/mL) e posteriormente procedeu-se à extração com 40 mL de etanol 80% a 80 °C durante 1h 30 min. De seguida, procedeu-se à filtração e evaporação do etanol (evaporador rotativo Büchi K-210) e o sobrenadante obtido foi lavado três vezes sucessivas com 10 mL de éter etílico. Após concentração a 40 °C, o resíduo sólido foi redissolvido em água para um volume final de 5 mL, filtrado (filtros de nylon de 0,2 µm) para *vials* e analisado por HPLC-RI.

Os açúcares foram determinados usando o HPLC (Knauer, sistema Smartline) a 35 °C. O sistema de HPLC estava equipado com um detetor de RI (Knauer Smartline 2300) e com uma coluna 100-5 NH₂ Eurospher (4,6 x 250 mm, 5 mm, Knauer). A fase móvel foi acetonitrilo/água desionizada, 70:30 (v/v) com um caudal de 1 mL/min. A identificação dos açúcares foi feita comparando os tempos de retenção relativos dos picos das amostras com padrões. Os resultados foram obtidos pelo método do padrão interno e expressos em g por 100 g de massa fresca (fw).

3.3.3. Ácidos orgânicos

Os ácidos orgânicos foram determinados após um procedimento previamente descrito por Barros *et al.* (2013).

As amostras de alho (1.5 g) foram extraídas por agitação com 25 mL de ácido metafosfórico (25 °C a 150 rpm) durante 25 min e, filtradas através de papel Whatman N ° 4. Posteriormente, as amostras foram filtradas através de filtros de nylon de 0,2 µm.

A análise foi realizada utilizando uma série Shimadzu 20A series UFLC (Shimadzu Corporation). A separação foi conseguida através de uma (Phenomenex), coluna de fase inversa C18 SphereClone (5 µm, 250×4,6 mm), termostaticado a 35 ° C. A eluição foi realizada com ácido sulfúrico 3,6 mM usando um caudal de 0,8 mL/min. A detecção foi levada a cabo num DAD, utilizando 215 nm e 245 nm (para o ácido ascórbico) como comprimentos de onda. Os ácidos orgânicos encontrados foram quantificados por comparação da área dos seus picos registados a 215 nm com as curvas de calibração obtidas a partir de produtos comerciais de cada composto. Os resultados foram expressos em mg por 100 g de massa fresca (fw).

3.4. Compostos Lipofílicos

3.4.1. Ácidos gordos

Os ácidos gordos foram determinados por cromatografia gasosa com detecção por ionização de chama (GC-FID), como descrito anteriormente por Grangeia et al. (2011), e após o seguinte processo de trans-esterificação. A massa obtida por extração em Soxhlet foi misturada com 5 mL de metanol/ácido sulfúrico/tolueno 2:1:1 (v/v/v), durante pelo menos 12 h, num banho a 50 °C a 160 rpm; de seguida, adicionaram-se 3 mL de água desionizada, para obter a separação das fases. A FAME foi recuperada com 3 mL de éter etílico em agitação no *vortex*; fez-se passar o sobrenadante através de uma microcoluna de sulfato de sódio anidro, a fim de eliminar a água; recuperou-se a amostra para um *vial* com tampa contendo membrana de teflon e filtrou-se com um filtro de nylon 0,2 µm Milipore.

O perfil de ácidos gordos foi obtido num GC modelo DANI 1000 equipado com um injetor *split/splitless*, detetor de ionização de chama (FID) e uma coluna Macherey Nagel (30 m×0,32 mm×0,25 µm). O programa de temperatura do forno foi o seguinte: a temperatura inicial da coluna foi 50 °C, durante 2 min; em seguida, aumentou-se a temperatura a 30 °C/min até 125 °C, 5 °C/min até 160 °C, 20 °C/min até 180 °C, 3 °C/min até 200 °C, 20 °C/min até 220 °C que permaneceu durante 15 min. O gás de transporte (hidrogénio) tinha um caudal de 4,0 mL/min (0,61 bar), medido a 50 °C. A injeção *split* (1:40) foi realizada a 250 °C. Para cada análise, injetou-se 1 µL da amostra.

A identificação de ácidos gordos foi feita com base nos tempos de retenção relativos dos picos da FAME e das amostras. Os resultados foram processados usando o software CSW 1,7 (DataApex 1,7) e expressos em percentagem relativa de cada ácido gordo.

3.4.2. Tocoferóis

Os tocoferóis presentes nas amostras foram determinados de acordo com o procedimento otimizado pelos autores Heleno, Barros, Sousa, Martins, & Ferreira (2010). Antes de se proceder à extração, adicionou-se às amostras uma solução de BHT (2,6-di-*terc*-butil-4-metilfenol) em hexano (10 mg/mL, 100 µL) e o padrão interno (PI) de tocol em hexano (50 µg/mL; 400 µL). As amostras liofilizadas (~500 mg) foram homogeneizadas com 4 mL de metanol num vórtex durante 1 min. De seguida, adicionaram-se 4 mL de hexano procedendo-se, posteriormente, a nova homogeneização no vórtex (1 min). Posteriormente adicionou-se ainda 2 mL de uma solução aquosa saturada de cloreto de sódio, homogeneizou-se no vórtex (1 min), centrifugou-se (centrifuga refrigerada Centurion K240R-2003, 5 min, 4000g) e transferiu-se o sobrenadante para um frasco rodeado de gelo e protegido da luz. As amostras foram re-extraídas mais duas vezes com hexano. Os extratos foram levados à *secura* recorrendo a uma corrente de azoto, re-dissolvidos em 2 mL de hexano, desidratados com sulfato de sódio anidro, filtrados (filtro de 0,22 µm), transferidos para *vials* âmbar e analisados por HPLC-fluorescência.

O equipamento de HPLC consistia num sistema integrado com uma bomba quaternária (Smartline 1000, Knauer), um desgaseificador (Smartline 5000), um amostrador automático (AS-2057 2500) e um detetor de fluorescência (Jasco)

programado para excitação a 290 nm e emissão a 330 nm. Os dados foram analisados usando o *software* Clarity 2,4 (DataApex). A separação cromatográfica foi conseguida com uma coluna em fase normal Poliamida II (250×4,6 nm) YMC da Waters, operando a 30 °C (forno 7971 R Grace). A fase móvel utilizada foi uma mistura de hexano e acetato de etilo (70:30, v/v) com um caudal de 1 mL/min. A quantificação foi baseada na resposta do sinal de fluorescência, usando o método do padrão interno e por comparação cromatográfica com padrões. Os resultados foram expressos em µg por 100 g de massa fresca (fw).

3.5. Avaliação das propriedades bioativas

3.5.1. Preparação dos extratos e considerações gerais

As amostras liofilizadas (1,5 g) foram submetidas a uma extração sólido-líquido por agitação com metanol (30 mL) a 25 °C a 150 rpm durante 1 h e filtrado através de papel Whatman No. 4. O resíduo obtido foi re-extraído com uma porção adicional de metanol. Os extratos metanólicos combinados foram evaporados a pressão reduzida e re-dissolvidos em metanol a fim de obter uma concentração final de 40 mg/mL (solução *stock*) e armazenados a 4 °C para o uso posterior.

3.5.2. Atividade antioxidante

Aos extratos mencionados na secção 2.5.1., foram efetuadas diluições sucessivas a partir da solução *stock*, com o objetivo de obter soluções de diferentes concentrações (20; 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625; 0,3125; 0,15625 mg/mL) a fim de as submeter a testes *in vitro* para avaliar as suas propriedades antioxidantes. O padrão utilizado como controle positivo foi o Trolox.

3.5.2.1. Atividade bloqueadora de radicais DPPH

Esta metodologia foi realizada recorrendo ao leitor de microplacas ELX800 (Biotek, Instruments Inc), em microplacas de 96 poços. A mistura de reação em cada um dos poços consistia em: soluções dos extratos com diferentes concentrações (30 µL) e solução metanólica contendo radicais DPPH (6×10^{-5} mol/L, 270 µL). A mistura foi mantida em repouso e ao abrigo da luz durante 60 min, para a estabilização dos valores de absorvância, sendo avaliada posteriormente a redução do radical DPPH pela medição

da absorvância a 515 nm. A atividade captadora de radicais livres (RSA) foi calculada como uma porcentagem de descoloração de DPPH usando a seguinte equação:

$$\% \text{ RSA} = [(A_{\text{DPPH}} - A_s) / A_{\text{DPPH}}] \times 100$$

Nesta equação, A_s corresponde à absorvância da solução que contém a amostra e A_{DPPH} é a absorvância da solução de DPPH. O valor de EC_{50} (concentração de amostra responsável pela captação de 50% de radicais DPPH) foi calculado por interpolação gráfica da porcentagem de ACR em função da concentração da amostra.

3.5.2.2. Poder Redutor

Esta metodologia foi realizada utilizando o leitor de microplacas mencionado anteriormente e foi avaliada a capacidade de reduzir Fe^{3+} a Fe^{2+} . As soluções de extrato com diferentes concentrações (0,5 mL) foram misturadas com tampão fosfato de sódio (200 mmol/L; pH 6,6; 0,5 mL) e ferricianeto de potássio (1% w/v; 0,5 mL). A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 min e, de seguida, adicionou-se ácido tricloroacético (10% w/v; 0,5mL). A mistura (0,8 mL) foi colocada em microplacas de 48 poços, assim como água desionizada (0,8 mL) e cloreto de ferro (0,1% w/v; 0,16 mL). Posteriormente, as microplacas foram lidas a uma absorvância de 690 nm.

A concentração de amostra que fornece 0,5 de absorvância (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração da amostra.

3.5.2.3. Inibição da descoloração do β -caroteno/linoleato

Foi preparada uma solução por dissolução de β -caroteno (2 mg) em clorofórmio (10 ml) e transferiram-se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo. Após remoção do clorofórmio a 40 °C, sob vácuo, juntou-se ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL) e agitou-se vigorosamente.

Uma alíquota (4,8 mL) desta emulsão foi transferida para tubos de ensaio contendo diferentes concentrações dos extratos (0,2 mL). Os tubos foram agitados e incubados a 50 °C em banho-maria. Imediatamente após a adição da emulsão a cada tubo mediu-se a absorvância a 470 nm no tempo zero (absorvância inicial). Posteriormente, os tubos foram mantidos a 50 °C durante 2h e foi medida novamente a absorvância, sendo esta designada de absorvância após 2h de ensaio.

A inibição da descoloração do β -caroteno/linoleato foi calculada utilizando a seguinte equação:

$$(\text{absorvância após 2 h de ensaio/absorvância inicial}) \times 100.$$

A concentração de extrato que leva a 50% de atividade antioxidante (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico de percentagem da inibição da descoloração do β -caroteno em função da concentração de extrato.

3.5.2.4. Inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Para a realização deste ensaio, foi utilizado tecido cerebral de porco (*Sus scrofa*), obtido a partir de animais de abate oficial. Este tecido foi dissecado e homogeneizado em gelo com tampão Tris-HCl (20mM, pH 7,4) para produzir um homogeneizado cerebral que foi centrifugado a 3000 g durante 10 min. Uma alíquota (100 μ L) do sobrenadante foi incubada com diferentes concentrações das soluções de extratos (200 μ L) na presença de sulfato de ferro (10 mM, 100 μ L) e ácido ascórbico (0,1 mM; 100 μ L) a 37 °C durante 1h. A reação foi parada com a adição do ácido tricloroacético (28% w/v, 500 μ L) seguindo-se a adição do ácido tiobarbitúrico (TBA, 2% w/v, 380 μ L) e a mistura foi submetida a 80 °C durante 20 min. Após centrifugação a 3000g durante 10 min, para a remoção do precipitado de proteínas, a intensidade da cor do complexo malondialdeído (MDA)-TBA do sobrenadante foi medida através da leitura da sua absorvância a 532 nm. Foi preparado um tubo de controlo com tampão Tris-HCl em vez de solução de extrato.

A percentagem de inibição de peroxidação lipídica (%) foi avaliada pela inibição da formação de TBARS (substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico) e calculada segundo a fórmula:

Inibição (%) = $[(A-B)/A] \times 100\%$, onde A e B correspondem à absorvância de controlo e da solução da amostra, respetivamente. A concentração de amostra correspondente a 50% de inibição da peroxidação lipídica (EC_{50}) foi calculada a partir do gráfico da percentagem de inibição da formação de TBARS em função da concentração de amostra.

3.5.3. Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada de acordo com o protocolo de Pereira, Barros, Alves, Santos-Buelga, & Ferreira (2016), utilizando microrganismos provenientes de isolados clínicos (Centro Hospitalar de Trás-os-Montes e Alto Douro, Vila Real, Portugal).

Para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos de alho foram usadas oito bactérias:

Bactérias Gram-positivo: *Enterococcus faecalis* (isolado de urina); *Listeria monocytogenes* (isolada de líquido cefalorraquidiano); *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) (isolado de expectoração); *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina (MSSA) (isolados de exsudado de ferida);

Bactérias Gram-negativo: *Acinetobacter baumannii* e *Pseudomonas aeruginosa* (isolados de expectoração), *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae* (isoladas de urina).

A identificação dos microrganismos e os testes de suscetibilidade foram feitos utilizando painéis MicroScan (MicroScan®; Siemens Medical Solutions Diagnostic, West Sacramento, CA, EUA) pelo método de microdiluição em placa.

A concentração mínima inibitória (CMI) foi determinada através do método de microdiluição e por ensaio colorimétrico utilizando o corante cloreto de *p*-iodonitrotetrazolium (INT). Os organismos viáveis provocaram uma alteração na cor de amarelo a cor-de-rosa. A CMI foi definida como sendo a menor concentração de extrato para inibir o crescimento bacteriano;

A CMB foi definida como a mínima concentração de extrato para matar as bactérias. Os ensaios foram realizados em duplicado.

3.6. Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicado e os resultados foram expressos em valores médios \pm desvio padrão (SD). Os resultados foram analisados por uma análise *one-way* de variância a (ANOVA) seguida de teste HSD Tukey's com $\alpha = 0,05$. A análise estatística foi realizada usando o programa IBM SPSS Statistics para Windows, versão 23.0. (IBM Corp., Armonk, Nova Iorque, EUA).

4. Resultados

4.1. Valor nutricional e compostos hidrofílicos

O valor nutricional e os compostos hidrofílicos encontrados nas amostras de *A. sativum* estão representados na **Tabela 1**. Os glúcidos foram os macronutrientes mais abundantes, seguidos das proteínas, cinzas e lípidos. Os valores mais elevados em glúcidos, cinzas, e contribuição energética foram encontrados na amostra de alho preto (BG), enquanto o conteúdo em proteínas foi maior para a amostra de agricultura tradicional proveniente do Algarve (TGA). O teor em lípidos foi maior para as amostras de agricultura tradicional de Trás-os-Montes (TGTM) e para BG, sem diferenças estatísticas. Estudos anteriores realizados em alho branco apresentaram resultados semelhantes àqueles encontrados na amostra de alho comercial oriundo de Espanha (CG) no que diz respeito ao teor em lípidos e proteínas, mas um menor teor em cinzas em comparação com o presente estudo (Hacisferogullari et al., 2004; Khalid et al., 2014; Suleria et al., 2012). A percentagem de humidade foi superior para a amostra TGTM e mais baixa para a amostra BG. Outros estudos também demonstraram uma menor percentagem de humidade (aproximadamente menos 20%) para amostras de alho preto quando comparadas com o alho branco (Bae, 2014; Choi, 2014).

Em relação aos açúcares livres (**Tabela 1**), a frutose foi o composto encontrado em maior abundância na amostra BG, enquanto a sacarose foi o mais abundante para as restantes amostras. A sacarose foi encontrada em maior concentração na amostra TGA e em menor concentração na amostra BG. A amostra de alho preto foi a única que apresentou xilose. O maior teor em glucose e frutose foi encontrado em BG e o menor teor em glucose verificou-se para a amostra TGA. Ao contrário deste estudo, Jeong et al. (2016) não detetaram glucose na amostra BG, mas as amostras de alho branco fresco apresentavam concentrações similares àquelas encontradas para a amostra CG. A concentração de frutose também foi significativamente maior para a amostra BG do que para a amostra de alho fresco. Li et al. (2015) e Mashayekhi et al. (2016) sugeriram que a temperatura e o tempo de armazenamento provocam uma diminuição na composição em açúcares do alho. Durante o processo de brotamento do alho a concentração de sacarose, glucose e frutose oscilam no tempo de acordo com o papel que cada um destes açúcares tem no crescimento do broto (Mashayekhi et al., 2016).

Foram detetados cinco ácidos orgânicos (**Tabela 1**), ácido oxálico, ácido málico, ácido pirúvico, ácido cítrico e ácido fumárico. A amostra CG foi a que apresentou um teor total mais elevado, enquanto BG apresentou o teor total mais baixo. Para CG, o ácido pirúvico foi o ácido orgânico predominante, seguido dos ácidos cítricos e oxálico. Para a amostra TGA o ácido mais abundante foi o oxálico e para a amostra TGTM foi o ácido cítrico. Para a amostra BG o ácido com maior concentração foi o ácido málico, seguido do ácido oxálico e quantidades vestigiais do ácido pirúvico. Em todas as amostras, com exceção da amostra de alho preto, foram identificados apenas vestígios do ácido fumárico

Tabela 1. Valor nutricional e compostos hidrofílicos de *A. sativum*.

	BG	CG	TGA	TGTM
Humidade (%)	54±3c	62±7b	64.7±0.5b	74±2a
Lípidos (g/100 g fw)	0.722±0.001a	0.47±0.02c	0.67±0.03b	0.74±0.02a
Proteínas (g/100 g fw)	7.4±0.1b	6.5±0.1c	7.8±0.2a	5.2±0.1d
Cinzas (g/100 g fw)	3.2±0.1a	2.9±0.1b	2.7±0.2c	1.60±0.04d
Glúcidos (g/100 g fw)	35±3a	28±2b	24.2±0.4b	18±2c
Energia (kcal/100 g fw)	177±8a	141±8b	134±2b	100±9c
Açúcares livres (g/100 g fw)				
Xilose	0.82±0.01	nd	nd	nd
Frutose	30.4±0.7a	0.45±0.01b	0.09±0.01d	0.20±0.01c
Glucose	2.14±0.03a	0.28±0.02b	0.04±0.01d	0.12±0.01c
Sacarose	0.23±0.05d	0.58±0.01b	1.35±0.01a	0.38±0.01c
Açúcares totais	33.6±0.7a	1.32±0.05bc	1.48±0.01b	0.70±0.01c
Ácidos orgânicos (g/100 g fw)				
Ácido oxálico	0.12±0.02c	0.13±0.01c	0.257±0.001a	0.20±0.01b
Ácido málico	0.32±0.01a	tr	0.006±0.003b	0.32±0.01a
Ácido pirúvico	tr	1.43±0.01a	1.38±0.01b	0.10±0.01c
Ácido cítrico	nd	1.07±0.01a	0.57±0.02c	0.82±0.02b
Ácido fumárico	nd	tr	tr	tr
Ácidos orgânicos totais	0.430±0.001d	2.64±0.01a	2.21±0.01b	1.44±0.01c

FW- massa fresca; nd- Não detetado; v- vestígios. Em cada fila, diferentes letras correspondem a diferenças significativas ($p < 0.05$). BG- alho preto; CG- alho comercial; TGA- alho de agricultura tradicional do Algarve; TGTM- amostra de agricultura tradicional de Trás-os-Montes.

Foram identificados 27 ácidos gordos (**Tabela 2**), dos quais os ácidos gordos saturados (SFA) foram predominantes na amostra BG, CG e TGTM, enquanto na amostra TGA os ácidos gordos polinsaturados (PUFA) foram os predominantes. Os PUFA predominaram em relação aos ácidos gordos monoinsaturados (MUFA) em todas as amostras, com exceção de BG.

Para a amostra de alho preto os ácidos gordos mais abundantes foram o palmítico (C16:0), o oleico (C18:1n9) e o esteárico (C18:0). Para as restantes amostras os ácidos gordos mais abundantes foram o linoleico (C18:2n6c), o palmítico (C16:0) e o oleico (C18:1n9). Os ácidos cáprico (C10:0), láurico (C12:0) e palmítico (C16:0) foram

identificados em estudos anteriores em amostras de alho branco, em percentagens inferiores às encontradas no presente estudo (Kamanna et al., 1980).

O α -tocoferol foi o único isómero de tocoferóis encontrado em todas as amostras, tendo sido predominante nas amostras CG (**Tabela 2**).

Tabela 2. Composição química em compostos lipofílicos de *A. sativum*.

	BG	CG	TGA	TGTM
Ácidos gordos (%)				
C6:0	1.4±0.1	1.01±0.01	0.61±0.05	1.4±0.1
C8:0	1.15±0.06	0.75±0.01	0.47±0.03	1.05±0.06
C10:0	3.06±0.01	1.93±0.04	1.17±0.04	2.61±0.06
C11:0	0.02±0.01	0.01±0.01	0.15±0.01	0.01±0.01
C12:0	1.80±0.07	1.15±0.04	0.69±0.01	1.46±0.02
C13:0	0.06±0.01	0.04±0.01	0.02±0.01	0.05±0.01
C14:0	6.7±0.3	4.4±0.2	2.59±0.02	5.5±0.3
C14:1	0.10±0.01	0.07±0.01	0.05±0.01	0.09±0.01
C15:0	1.00±0.04	0.72±0.03	0.55±0.01	0.80±0.02
C16:0	25.3±0.5	20.9±0.4	16.80±0.03	21.8±0.2
C16:1	0.64±0.03	0.56±0.01	0.49±0.01	0.67±0.01
C17:0	1.30±0.02	1.08±0.01	0.75±0.01	1.02±0.01
C18:0	16.4±0.2	11.2±0.1	7.13±0.01	12.4±0.2
C18:1n9	24.1±0.3	18.4±0.2	12.38±0.04	20.4±0.2
C18:2n6c	11.0±0.1	29.2±0.3	46.8±0.1	24.0±0.3
C18:3n3	2.14±0.01	5.03±0.04	5.74±0.01	3.61±0.03
C20:0	0.95±0.03	0.80±0.02	0.77±0.07	0.77±0.02
C20:1	0.05±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01	0.08±0.01
C20:2	0.01±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01	0.04±0.01
C20:3n6	0.06±0.01	0.05±0.01	0.02±0.01	0.04±0.01
C20:4n6	0.29±0.01	0.17±0.01	0.09±0.01	0.21±0.01
C20:3n3	0.31±0.01	0.23±0.01	0.22±0.01	0.21±0.01
C20:5n3	0.12±0.01	0.05±0.01	0.06±0.01	0.12±0.01
C22:0	1.18±0.05	1.23±0.05	1.35±0.01	1.07±0.04
C22:1n9	0.03±0.01	0.09±0.01	nd	0.04±0.01
C23:0	0.23±0.01	0.36±0.02	0.37±0.01	0.31±0.02
C24:0	0.57±0.06	0.52±0.01	0.57±0.04	0.41±0.01
SFA	61.1±0.4a	46.0±0.5c	34.0±0.2d	50.6±0.5b
MUFA	25.0±0.3a	19.2±0.2c	13.00±0.03d	21.2±0.2b
PUFA	13.90±0.09d	34.8±0.3b	53.0±0.1a	28.2±0.3c
Tocoferóis (µg/100g FW)				
α-Tocoferol	180±2b	203±4a	140±1d	152±3c
FW- massa fresca; nd- não detetado; SFA- Ácidos gordos saturados; MUFA- Ácidos gordos monoinsaturados; PUFA- Ácidos gordos polinsaturados. Em cada fila, diferentes letras correspondem a diferenças significativas ($p<0,05$). BG- alho preto; CG- alho comercial; TGA- alho de agricultura tradicional do Algarve; TGTM- amostra de agricultura tradicional de Trás-os-Montes.				

4.2. Propriedades Bioativas

A atividade antioxidante foi avaliada através de quatro métodos distintos, como demonstrado na **Tabela 3**. Todas as amostras apresentaram atividade antioxidante, destacando-se a amostra de alho preto (BG), que revelou os valores de EC₅₀ mais baixos para todos os testes, o que significa maiores propriedades antioxidantes. Das amostras de alho branco, a CG foi aquela com melhores resultados de DPPH, poder redutor e capacidade de inibição da peroxidação lipídica avaliada pelo ensaio de TBARS. TGTM apresentou os melhores resultados para o ensaio da inibição do β-caroteno. Nas amostras CG, TGA e TGTM os valores de EC₅₀ variaram pouco entre si. No entanto, a amostra de alho preto foi a que apresentou valores significativamente mais baixos.

Bae et al. (2014), Choi et al. (2014) e Jeong et al. (2016) apresentaram resultados semelhantes de DPPH e de poder redutor para amostras de alho preto (amostras de alho fresco adquiridas em mercados locais coreanos e submetidas a tratamento térmico pelos autores). As amostras de alho branco também apresentaram resultados semelhantes de poder redutor e DPPH aos reportados por Khalid et al. (2014) que estudou amostras de alho branco provenientes de mercados locais no Paquistão.

Tabela 3. Propriedades antioxidantes das diferentes amostras de *A. sativum* (desvio padrão ± SD).

	BG	CG	TGA	TGTM
Atividade antioxidante (valores de EC ₅₀ , mg/mL)				
Atividade bloqueadora de radicais DPPH	4.4±0.2d	26±1c	33.8±0.2a	31±1b
Poder redutor	1.25±0.04d	14.7±0.2c	26.9±0.2a	19.9±0.2b
Inibição do β-caroteno/linoleato	0.27±0.01d	0.44±0.01b	0.46±0.01a	0.39±0.01c
TBARS	0.39±0.01d	0.88±0.06c	2.3±0.1a	1.0±0.1b

EC₅₀: Concentração de extrato correspondente a 50% da atividade antioxidante ou 0,5 de absorvância no ensaio do poder redutor. Trolox (controlo positivo), os valores de EC₅₀ são: 41 µg/mL poder redutor); 42 µg/mL (DPPH); 18 µg/mL (inibição do β-caroteno) e 23 µg/mL (TBARS). Em cada fila, diferentes letras correspondem a diferenças significativas ($p < 0,05$). BG- alho preto; CG- alho comercial; TGA- alho de agricultura tradicional do Algarve; TGTM- amostra de agricultura tradicional de Trás-os-Montes.

Relativamente á atividade antimicrobiana (**Tabela 4**), foram testados isolados clínicos provenientes de ambiente hospitalar com o intuito de verificar a atividade antimicrobiana dos extratos em bactérias com diferentes perfis de resistência a diversos antibióticos usados na prática clinica.

Dos diferentes extratos de alho testados, o alho preto (BG) demonstrou atividade antibacteriana contra todos os isolados clínicos testados. É evidente a maior atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivo, das quais se destacaram o MSSA e MRSA com uma CMI de 3,1 mg/mL, seguidas de *E. faecalis* e *L. monocytogenes*. Relativamente às bactérias Gram-negativo os melhores resultados de CMI foram obtidos para a *E. coli* seguidos de *P. aeruginosa*. Os melhores valores de CMB na amostra BG foram obtidos em MRSA e *E. coli* (CMB = 50 mg/mL), seguidos de MSSA, *P. aeruginosa* e *A. baumannii* (CMB = 100 mg/mL).

As amostras de alho branco (CG, TGA e TGTM) apresentaram resultados similares para a maioria das estirpes, não apresentando atividade bactericida. No entanto, a amostra TGTM apresentou os melhores resultados inibitórios com valores CMI de 50 mg/mL para o MRSA e 100 mg/mL para *L. monocytogenes*, MSSA e *A. baumannii*. A amostra CG apenas apresentou inibição da bactéria MRSA e a amostra TGA apresentou o melhor resultado de CMI para *L. monocytogenes* e *A. baumannii*.

Um estudo anterior utilizando extratos de alho branco demonstrou igualmente uma baixa atividade microbiana contra a maioria das estirpes estudadas, apresentando também uma maior inibição contra a estirpe *S. aureus* (Khalid et al., 2014).

Tabela 4. Atividade antimicrobiana de diferentes amostras do extrato de *A. sativum* (CMI e CMB, mg/mL).

Amostras de alho	Bactérias Gram-positivo				Bactérias Gram-negativo				
		<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Listeria monocytogenes</i>	MSSA	MRSA	<i>Acinetobacter baumannii</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
BG	CMI	6,25	12,5	3,125	3,125	100	25	100	50
	CMB	>100	>100	100	50	100	50	>100	100
CG	CMI	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100	>100
	CMB	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
TGA	CMI	>100	100	>100	>100	100	>100	>100	>100
	CMB	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100	>100
TGTM	CMI	>100	100	100	50	100	>100	>100	>100
	CMB	>100	>100	>100	>100	100	>100	>100	>100

CMI - concentração mínima inibitória; CMB- concentração mínima bactericida; MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível á metilina; MRSA - *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina; BG- alho preto; CG- alho comercial; TGA- alho de agricultura tradicional do Algarve; TGTM- amostra de agricultura tradicional de Trás-os-Montes.

5. Conclusão

No presente trabalho caracterizou-se quimicamente e avaliaram-se as propriedades bioativas de alho cultivado (*Allium sativum* L.). Por outro lado, fez-se a comparação entre amostras submetidas a diferentes tratamentos, tendo em conta a sua origem geográfica e o tipo de sistema de produção agrícola. Para tal foram utilizadas três amostras de alho branco (duas amostras portuguesas de agricultura tradicional e uma espanhola de agricultura intensiva) e uma amostra de alho preto originária de Espanha. O alho preto resulta de um tratamento térmico que provoca alterações organoléticas.

A caracterização química e nutricional das amostras incluiu a determinação de humidade, lípidos, proteínas, cinzas, glúcidos e valor energético. Foram ainda analisados os açúcares livres, ácidos orgânicos, tocoferóis e os perfis individuais de ácidos gordos. A avaliação da atividade antioxidante fez-se através de quatro ensaios distintos: atividade bloqueadora de radicais livres de DPPH, poder redutor, inibição da descoloração do β -caroteno/linoleato e inibição da peroxidação lipídica na presença de substâncias reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS). A atividade antimicrobiana foi avaliada através do método da microdiluição.

Nutricionalmente a amostra de alho preto, quando comparada com as restantes amostras, apresentou uma menor percentagem de humidade, maior teor em açúcares e valor energético superior. Estes resultados refletem as características particulares do alho processado e as suas diferenças organoléticas (textura gelatinosa e sabor adocicado do alho preto). Em termos de composição química, no alho preto foram detetados um menor número de ácidos orgânicos. Sendo que o α - tocoferol foi o único tocoferol encontrado em todas as amostras.

Relativamente às propriedades bioativas, este estudo veio demonstrar, tal como descrito na literatura, que o alho apresenta potencial antioxidante e antimicrobiano. Os resultados das amostras de alho branco não apresentaram diferenças significativas entre si, tendo-se destacado a amostra comercial. Já a amostra de alho preto apresentou resultados significativamente diferentes quando comparados com as amostras de alho branco.

Em geral, no que diz respeito às propriedades antioxidantes, o alho preto foi aquele que apresentou os melhores resultados, embora todas as amostras demonstraram potencial nos quatro ensaios realizados.

Quanto ao potencial antimicrobiano as amostras de alho branco demonstraram um baixo potencial, ao contrário da amostra de alho preto que apresentou resultados bastante satisfatórios, com especial destaque para a atividade para o MRSA.

Tendo em conta que a Organização Mundial de Saúde (OMS) aponta a resistência aos antibióticos como um dos problemas mais preocupantes do séc. XXI, estes resultados sugerem que o alho preto é um produto a ter em consideração para combater estirpes microbianas resistentes a antibióticos.

A partir dos resultados obtidos no presente trabalho pode concluir-se que o tratamento térmico foi o fator que mais influenciou alterações na composição química e nas propriedades bioativas do alho. A origem e o tipo de sistema agrícola demonstraram igualmente alguma influência nas propriedades químicas e bioativas de *A. sativum*. No entanto, tendo em conta que não temos dados concretos quanto às condições de cultivo e quanto às variedades das espécies de alho branco, não é possível afirmar com certeza o grau de influência desses fatores. Para melhor avaliar esta influência seria interessante desenvolver um estudo no qual as condições de cultivo fossem controladas.

Os resultados deste estudo vêm reforçar a importância do alho na dieta e dos seus benefícios para a saúde. A partir destes resultados pode-se igualmente concluir que produtos inovadores, como o alho preto, podem melhorar as propriedades bioativas do produto.

Na sequência deste trabalho vai ser estudado o perfil em ácidos fenólicos das amostras. No entanto, para uma melhor comparação entre as amostras de alho branco e de alho preto seria interessante submeter amostras com a mesma origem a tratamento térmico com o intuito de inferir a influência deste tipo de processamento nos resultados. Existem alguns estudos neste sentido mas que pretendem comparar diferentes momentos do tratamento térmico de forma a perceber quais as melhores condições de processamento.

Na indústria alimentar, poderia apostar-se na incorporação de extratos de alho preto em alimentos (por exemplo enchidos) para aumentar o tempo de prateleira e como substituto de conservantes artificiais, devido às suas características antimicrobianas. Para tal, teria grande interesse que se desenvolvessem estudos que permitissem

perceber se, quando incorporado em diferentes produtos alimentares o alho preto mantém as suas características bioativas.

Também a nível farmacêutico poderiam ser desenvolvidos estudos que explorassem a possível utilização do alho preto (em fitoterapia) ou de algum dos seus compostos como antibiótico.

Outra linha de investigação possível seria testar o tratamento térmico noutros alimentos com propriedades bioativas reconhecidas de modo a perceber se nesses alimentos se verifica igualmente uma melhoria dessas propriedades.

Independentemente de qual a linha de investigação que possa a vir seguida, será de todo o interesse estudar o alho preto de forma mais detalhada para melhor explorar todas as potencialidades deste produto.

6. Bibliografia

- Angeles, T. M., Jesús, P., Rafael, M., Tania, M. (2016). Evolution of some physicochemical and antioxidant properties of black garlic whole bulbs and peeled cloves. *Food Chemistry*, 199, 135-139.
- Amagase, H., Petesch, B.L., Matsuura, H., Kasuga, S., Itakura, Y. (2001). Intake of Garlic and Its Bioactive Components. *The Journal of Nutrition*, 955S-962S.
- AOAC. (2016). *Official Methods of Analysis of AOAC International. Association of Official Analysis Chemists International* (20th Editi).
- Bae, S.E., Cho, S.Y., Won, Y.D., Lee, S.H., Park, H.J. (2014). Changes in S-allyl cysteine contents and physicochemical properties of black garlic during heat treatment. *LWT - Food Science and Technology*, 55, 397 – 402.
- Barros, L., Pereira, E., Calhelha, R.C., Dueñas, M., Carvalho, A. M., Santos-Buelga, C., Ferreira, I.C.F.R. (2013). Bioactivity and chemical characterization in hydrophilic and lipophilic compounds of *Chenopodium ambrosioides* L. *Journal of Functional Foods*, 5, 1732-1740.
- Beato, V.M., Orgaz, F., Mansilla, F., Montaña, A. (2011). Changes in Phenolic Compounds in Garlic (*Allium sativum* L.) Owing the Cultivar and Location of Growth. *Plant Foods for Human Nutrition*, 66, 218-223.
- Borek, C. (2001). Antioxidant health effects of aged garlic extract. *Journal of Nutrition*, 131(3s), 1010S–1015S.
- Borlinghaus, J., Albrecht, F., Gruhlke, M.C.H., Nwachukwu, I.D., Slusarenko, A.J. (2014). Allicin: Chemistry and Biological Properties. *Molecules*, 19, 12591-12618.
- Buhk, C., Alt, M., Steinbauer, M.J., Beierkuhnlein, C., Warren, S. D., Jentsch, A. (2017) Homogenizing and diversifying effects of intensive agricultural land-use on plant species beta diversity in Central Europe - A call to adapt our conservation measures. *Science of the Total Environment*, 576, 225–233.
- Choi, I.S., Cha, H.S., Lee, Y.S. (2014) Physicochemical and Antioxidant Properties of Black Garlic. *Molecules*, 19, 16811-16823.
- Cunha, A.P., Silva, A.P., Roque, O.R. (2006). *Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia* (2ª Edição). Fundação Calouste Gulbenkian. ISBN: 972-31-1010-5.

- Cunha, A.P., Ribeiro, J.A., Roque, O.R. (2009). *Plantas Aromáticas em Portugal – Caracterização e Utilizações (2ª Edição)*. Fundação Calouste Gulbenkian. ISBN: 978-972-31-1170-5.
- Coccygodynious. (2012). DeviantArt. (Disponível em: <https://coccygodynious.deviantart.com/art/Allium-sativum-307992233>). [Consultado em 10 de Janeiro de 2017]
- El-Sayed, H.S., Chizzola, R., Ramadan, A.A., Edris, A.E. (2017). Chemical composition and antimicrobial activity of garlic essential oils evaluated in organic solvent, emulsifying, and self-microemulsifying water based delivery systems. *Food Chemistry*, 221, 196-204.
- FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations, (2014). FAOSTAT (Disponível em: <http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC>). [Consultado em 27 de dezembro de 2016]
- Fintelmann, V., Weiss, R.F. (2010). *Manual de Fitoterapia*. Guanabara Koogan. ISBN: 978-85-277-1620-8.
- Fратиани, F., Ombra, M. N., Cozzolino, A., Riccardi, R., Spigno, P., Tremonte, P., Coppola, R., Nazzaro, F. (2016). Phenolic constituents, antioxidant, antimicrobial and anti-proliferative activities of different endemic Italian varieties of garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Functional Foods*, 21, 240-248.
- Fujisawa, H., Watanabe, K., Suma, K., Origuchi, K., Matsufuji, H., Seki, T., Ariga, T. (2009). Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. *Bioscience Biotechnology Biochemistry*, 73 (9), 1948–1955.
- Grangeia, C., Heleno, S. A., Barros, L., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2011). Effects of trophism on nutritional and nutraceutical potential of wild edible mushrooms. *Food Research International*, 44, 1029–1035.
- Ha, W.A., Ying, T., Kim, W.K. (2015). The effects of black garlic (*Allium sativum*) extracts on lipid metabolism in rats fed a high fat diet. *Nutrition Research and Practice*, 9, 30-36.
- Haciseferogullari, H., Ozcan, M., Demir, F., Calisir, S. (2004). Some nutritional and technological properties of garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of Food Engineering*. 68, 463-469.
- Heber, D. (1997). The stinking rose: Organosulfur compounds and cancer. *American Journal of Clinical Nutrition*, 66, 425-426.

- Heleno, S. A., Barros, L., Sousa, M. J., Martins, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2010). Tocopherols composition of Portuguese wild mushrooms with antioxidant capacity. *Food Chemistry*, 119, 1443–1450.
- International Plant Names Index (2005). Versão 1.2.5.1.1.2 (Disponível em: <http://www.ipni.org/ipni/idPlantNameSearch.do?id=528796-1>). [Consultado em 8 de agosto de 2016]
- Jastrzebski, Z., Leontowicz, H., Leontowicz, M., Namiesnik, J., Zachwieja, Z., Barton, H., Pawelzik, E., Arancibia-Avila, P., Toledo, F., Gorinstein, S. (2007). The bioactivity of processed garlic (*Allium sativum* L.) as shown in vitro studies on rats. *Food and Chemical Toxicology*, 45, 1626-1633.
- Jung, E., Park, S., Choi, E., Ryu, B., Park, B., Kim, D., Kim, Y., Chae, S. (2014). Reduction of blood lipid parameters by a 12-wk supplementation of aged black garlic: A randomized controlled trial. *Nutrition*, 30, 1034-1039.
- Kamanna, V.S., Chandrasekhara, N., (1980). Fatty Acid Composition of Garlic (*Allium sativum* Linnaeus) Lipids. *Journal of the American Oil Chemists Society*.
- Khalid, N., Ahmed, I., Latif, M.S.Z., Rafique, T., Fawad, S. A. (2014). Comparison of Antimicrobial Activity, Phytochemical Profile and Minerals Composition of Garlic *Allium sativum* and *Allium tuberosum*. *Journal Korean Society for Applied Biological Chemistry*. 57, 311-317.
- Jeong, Y.Y., Ryu, J.H., Shin, J., Kang, M.J., Kang, J.R., Han, J., Kang, D. (2016). Comparison of anti-oxidant and anti-inflammatory effects between fresh and aged black garlic extracts. *Molecules*, 21, 430.
- Kallel, F., Driss, D., Chaari, F., Belghith, L., Bouaziz, F., Ghorbel, R., Chaabouni, S. E. (2014). Garlic (*Allium sativum* L.) husk waste as a potential source of phenolic compounds: Influence of extracting solvents on its antimicrobial and antioxidant properties. *Industrial Crops and Products*, 62, 34-41.
- Kim, S., Park, S., Lee, S., Lee, S., Ko, S., Yoo, M. (2016). UPLC/ESI-MS/MS analysis of compositional changes for organosulfur compounds in garlic (*Allium sativum* L.) during fermentation. *Food Chemistry*, 211, 555–559.
- Lanzotti, V., Scala, F., Bonanomi, G. (2014). Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. *Phytochemistry Reviews*, 13, 769-791.
- Lee, Y., Gweon, O., Seo, Y., Im, J., Kang, M., Kim, M., Kim, J. (2009). Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutrition Research and Practice*, 3, 156-161.

- Li, W., Zhou, H., Hu, X., Ou, S., Yan, R., Liao, X., Huang, X., Fu, L. (2015). Characterization of Phenolic Constituents Inhibiting the Formation of Sulfur-Containing Volatiles Produced during Garlic Processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 787-794.
- Liang, T., Wei, T., Lu, Y., Kodani, Y., Nakada, M., Miyakawa, T., Tanokura, M. (2015). Comprehensive NMR analysis of compositional changes of black garlic during thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 63, 683–691.
- Martins, N., Petropoulos, S., Ferreira, I.C.F.R. (2016). Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. *Food Chemistry*, 211, 41-50.
- Mashayekhi, K., Chiane, S.M., Mianabadi, M., Ghaderifar, F., Mousavizadeh, S.J. (2016). Change in carbohydrate and enzymes from harvest to sprouting in garlic. *Food Science and Nutrition*. 4(3), 370-376.
- Manzocco, L., Calligaris, S., Mastrocola, D., Nicoli, M.C., Lerici, C.R. (2001). Review of nonenzymatic browning and antioxidante capacity in processed foods. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 340–346.
- Montaño, A., Casado, F.J., Castro, A., Sánchez, A. H., Rejano, L. (2004). Vitamin Content and Amino Acid Composition of Pickled Garlic Processed with and without Fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 52, 7324-7330.
- Navarro, M. C. (2007). Posibilidades terapéuticas del bulbo de ajo (*Allium sativum*). *Revista de Fitoterapia*, 7(2), 131-151.
- Nencini, C., Menchiari, A., Franchi, G.G., Micheli, L. (2011). Plant Foods for Human Nutrition, 66, 11–16.
- Pereira, C., Barros, L., Alves, M., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). Artichoke and milk thistle pills and syrups as sources of phenolic compounds with antimicrobial activity. *Food and Function*, 7, 3083–3090.
- Ramirez, D. A., Locatelli, D. A., Torres-Palazzolo, C. A., Altamirano, J. C., Camargo, A. B. (2017). Development of garlic bioactive compounds analytical methodology based on liquid phase microextraction using response surface design. Implications for dual analysis: Cooked and biological fluids samples. *Food Chemistry*, 215, 493–500.

- Ried, K. (2016). Garlic Lowers Blood Pressure in Hypertensive Individuals, Regulates Serum Cholesterol, and Stimulates Immunity: An Updated Meta-analysis and Review. *Journal of Nutrition*, 389S - 396S
- Suleria, H.A.R., Butt, M.S., Anjum, F.M., Saeed, F., Batool, R., Ahmad, A.N. (2012). Aqueous garlic extract and its phytochemical profile; special reference to antioxidant status. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*. 63(4), 431-439.
- The Plant List (2013). Versão 1.1. (Disponível em: <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/record/kew-296499>). [Consultado em 8 de agosto de 2016]
- Vinson, J.A., Hao, Y., Su, X., Zubik, L. (1998). Phenol antioxidante quantity and quality in foods: Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 46, 3630–3634.
- Wang, X., Liu, R., Yang, Y., Zhang, M. (2015). Isolation, purification and identification of antioxidants in an aqueous aged garlic extract. *Food Chemistry*, 187, 37–43.
- Zhou, Y., Li, Y., Zhou, T., Zheng, J., Li, S., Li, W. (2016) Dietary Natural Products for Prevention and Treatment of Liver Cancer. *Nutrients*, 8, 156.

Material Suplementar

Tabela 1. Perfil de resistência de bactérias Gram positivas e Gram negativas a diferentes antibióticos; valores de CMI ($\mu\text{g/mL}$).

	Amoxicilina/Ácido clavulânico	Amicacina	Ampicilina	Gentamicina	Tobramicina	Vancomicina
Gram negative						
<i>E. coli</i>	$\leq 8/4$ S	na	>16 R	≤ 2 R	na	
<i>K. pneumoniae</i>	$\leq 8/4$ S	na	>16 R	≤ 2 S	na	
<i>A. baumannii</i>	Na	na	na	>4 R	<2 S	
<i>P. aeruginosa</i>	Na	≤ 8 S	na	> 4 R	> 4 R	
Gram positive						
MRSA	Na	na	na	na	na	≤ 2 S
MSSA	Na	na	na	na	na	≤ 2 S
<i>E. faecalis</i>	Na	na	≤ 1 S	na	na	≤ 2 S
<i>L. monocytogenes</i>	Na	na	≤ 1 S	na	na	na

MSSA - *Staphylococcus aureus* sensível à meticilina; MRSA - *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina; S- Suscetível; ; R- Resistente: esta classificação foi feita de acordo com os “breakpoints” sugeridos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) e pelo European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing (EUCAST); na- não aplicável.