



Tesis Doctoral

Optimización del proceso de elaboración y caracterización fisiológica y físico-química del ajo negro



**M^aÁngeles
Toledano Medina**

UNIVERSIDAD DE CÓRDOBA

TITULO: *Optimización del proceso de elaboración y caracterización fisiológica y físico-química del ajo negro*

AUTOR: *María Ángeles Toledano Medina*

© Edita: UCOPress. 2017
Campus de Rabanales
Ctra. Nacional IV, Km. 396 A
14071 Córdoba

www.uco.es/publicaciones
publicaciones@uco.es



UNIVERSIDAD DE CORDOBA



Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera
CONSEJERÍA DE AGRICULTURA, PESCA Y DESARROLLO RURAL

“Optimización del proceso de elaboración y caracterización fisiológica y físico-química del ajo negro”

M Ángeles Toledano Medina

Junio 2017

Dirección: Dr. Rafael Moreno Rojas, UCO
Codirección: Dr. Jesús Pérez Aparicio, IFAPA



AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis hijos, María y Álvaro por ser la fuerza que impulsa mi vida y a Emilio, por su cariño y comprensión y por ser mi compañero en todas las aventuras de mi vida.

A mis padres por demostrarme en todo momento su apoyo incondicional y mostrarme su confianza ante todas las decisiones tomadas en mi vida.

A mis hermanas, esposos e hijos, por su cariño y por hacerme sentir su cercanía, a pesar de las distancias.

Al Dr. Rafael Rojas Moreno por su paciencia y comprensión en las distintas etapas de este proyecto y especialmente en la recta final.

Al Dr. Jesús Pérez Aparicio por su ayuda constante durante todo el largo viaje recorrido.

A mis compañeros del centro IFAPA de Palma del Río (Córdoba) por su colaboración, dedicación y esfuerzo.

Al IFAPA por darme la oportunidad de realizar este proyecto de investigación.

A la empresa Abuela Carmen, por su trato y su generosidad durante todos los ensayos realizados.

A la Universidad de Córdoba, al Programa de Doctorado Biociencias y Ciencias Agroalimentarias que ha permitido lograr esta meta.





TÍTULO DE LA TESIS: Optimización del proceso de elaboración y caracterización fisiológica y físico-química del ajo negro

DOCTORANDO/A: D. M^a Ángeles Toledano Medina

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS

(Se hará mención a la evolución y desarrollo de la tesis, así como a trabajos y publicaciones derivados de la misma).

La doctoranda ha desarrollado su tesis doctoral bajo nuestra supervisión directa en las Instalaciones de IFAPA de Palma del Río y la Universidad de Córdoba, optimizando el proceso de fabricación del ajo negro, a la vez que ha realizado la caracterización físico-química y fisiológica del mismo.

La tesis ha dado lugar a una publicación en revista indexada de alto impacto (D1): MA Toledano-Medina, J Pérez-Aparicio, R Moreno-Rojas, T Merinas-Amo (2016). Evolution of some physicochemical and antioxidant properties of black garlic whole bulbs and peeled cloves. Food chemistry 199, 135-139

En la actualidad hay otros dos trabajos que forman parte de la tesis, uno en revisión y otro del que se ha finalizado la redacción:

- Characterisation of physico-chemical and biological activities of black and white garlic: in vivo and in vitro assays
- Influencia de la variedad y el tiempo de almacenamiento del ajo fresco en las propiedades físico-químicas y fisiológicas del ajo negro

Por todo ello, se autoriza la presentación de la tesis doctoral.

Córdoba, 19 de junio de 2017

Firma del/de los director/es

Fdo.: Rafael Moreno Rojas

Fdo.: Jesús Pérez Aparicio

ÍNDICE DE CONTENIDOS

INFORME RAZONADO DEL/DE LOS DIRECTOR/ES DE LA TESIS.....	5
RESUMEN.....	9
ABSTRACT.....	13
INTRODUCCIÓN.....	17
1. MARCO TEÓRICO.....	17
1.1.EL AJO.....	17
1.1.1. Historia del ajo.....	17
1.1.2.Botánica del ajo.....	20
1.1.3. Composición bioquímica del ajo.....	21
1.1.4. Propiedades saludables del ajo.....	24
1.1.4.1. Efectos cardioprotectores.....	27
1.1.4.2. Actividad protectora del cáncer.....	31
1.1.4.3.Efectos protectores del cerebro.....	32
1.1.4.4.Diabetes.....	32
1.1.5.5.Actividad antimicrobiana.....	33
1.1.6. Factores a considerar que afectan los beneficios para la salud.....	34
1.1.7. Productos derivados del ajo.....	35
1.2. EL AJO NEGRO.....	37
1.2.1. Fabricación y caracterización del ajo negro.....	39
1.2.2. Composición química del ajo negro.....	41
1.2.3. Propiedades saludables del ajo negro.....	42
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	45
BIBLIOGRAFÍA CITADA EN LA INTRODUCCIÓN.....	46
ARTÍCULO 1.....	57
ARTÍCULO 2.....	71
ARTÍCULO 3.....	91
CONCLUSIONES GENERALES.....	137
ANEXO . Artículo publicado.....	141

RESUMEN

El ajo (*Allium sativum* L.) pertenece a la familia de las liliáceas y fue ampliamente cultivado y utilizado como especia por las civilizaciones antiguas: griegos, egipcios, chinos e indios. Numerosos trabajos de investigación estudian los efectos beneficiosos del consumo de ajo en la salud. Se ha reportado recientemente ser eficaz en la enfermedad cardiovascular, antihipertensivos, anti-diabética, y poseer muchas otras actividades biológicas incluyendo antimicrobiano, antioxidante, anticancerígeno, anti-mutagénico e inmunomodulador de actividades prebióticas.

El ajo (*Allium sativum*) es un ingrediente alimentario utilizado en nuestra gastronomía en numerosos platos. Las características organolépticas del ajo fresco, picor y una duración de su sabor en la boca mucho tiempo principalmente, provocan en parte de los consumidores un rechazo hacia los productos elaborados con ajo fresco, fundamentalmente. En este sentido, han sido muchas las maneras de incorporar ajo a la dieta intentando evitar este intenso sabor pungente.

El ajo negro, ha sido un producto que se ha elaborado tradicionalmente en los países asiáticos y que en los últimos años se ha introducido en países de occidente, como España, Alemania e Italia, e incluso en EEUU o Argentina. Es un producto clave por dos motivos fundamentales: tiene mejor aroma sabor que el ajo fresco y además tiene mayor capacidad antioxidante.

Esta creciente demanda del ajo negro ha fomentado que los países productores, entre ellos España, hayan diversificado su producción desarrollando el ajo negro bajo unas condiciones controladas, convirtiéndose además en un producto estrella, debido al alto precio que alcanza en los mercados.

Este trabajo de investigación ha tenido como principal objetivo la optimización del proceso de fabricación a la vez que la caracterización fisico-química y fisiológica del ajo negro.

De manera general, el trabajo de tesis se centró en dos ensayos de fabricación y caracterización fisicoquímica y nutraceútica (antioxidantes) del ajo negro y un ensayo de caracterización de algunas propiedades saludables del ajo fresco, comparándolas con diferentes tipos de ajo negro, con el objeto de caracterizar de manera evolutiva los cambios sucedidos en el ajo durante la fabricación

del ajo negro.

Los ensayos de fabricación de ajo negro sometiendo al ajo a diferentes temperaturas y variando el material vegetal: ajo en cabezas o pelados, diferentes variedades de ajo y diferentes tiempos de almacenamiento para la fabricación del ajo negro, bajo unas condiciones de temperatura y humedad constante. En ambos ensayos de fabricación se realizaron determinaciones para la caracterización fisicoquímica y antioxidante del ajo, en sus diferentes estadios durante la fabricación.

En el primer ensayo se utilizaron ajos pelados y cabezas de ajos y se sometieron las muestras a diferentes temperaturas, obteniendo muestras en el control inicial y en tres momentos más durante su fabricación. Se determinó el valor L (color), contenido en sólidos solubles, pH, aW, capacidad antioxidante, polifenoles e índice de polifenoles totales IPT.

En el segundo ensayo de fabricación se utilizó como material vegetal cabezas de ajos de tres variedades diferentes y con dos diferentes tiempos de almacenamiento distintos, tuvo como objetivo evaluar las diferencias entre variedades y tiempos de almacenamiento. Las muestras obtenidas de ajo fresco y de tres controles durante la fabricación, fueron analizadas determinando los siguientes parámetros: pH, acidez, °Brix, azúcares totales, capacidad antioxidante concentración de polifenoles.

Los resultados en los ensayos de fabricación permitieron concluir que el ajo negro difiere del ajo fresco en su color oscuro, valores sólidos solubles más altos, pH más bajo y mayor concentración de polifenoles y capacidad antioxidante. Igualmente, en estos ensayos se evidenció que pequeñas variaciones de temperatura en el proceso (72, 75 a 78 °C) influyen en la velocidad de cambio.

En cuanto al material vegetal utilizado, se concluye que el proceso de fabricación del ajo negro utilizando el ajo pelado anteriormente no difiere del ajo negro resultante de la fabricación del ajo negro con bulbos enteros, técnica tradicionalmente empleada. Las variaciones del material vegetal

en cuanto a variedades empleadas o tiempo de almacenamiento del ajo fresco utilizado en el segundo ensayo, influyen en la caracterización del producto tanto físico-química como nutracéutica.

El tercer ensayo se centró en analizar algunas de las propiedades saludables tanto del ajo fresco como de tres tipos de ajo negro, fabricado en diferentes tiempos de envejecimiento. Así, se caracterizaron a los productos atendiendo a la toxicidad, genotoxicidad, longevidad, citotoxicidad.

Los resultados de este ensayo mostraron que todos los tipos de ajo eran seguros sin mostrar toxicidad y con 13 días de procesado de ajo negro, mostró una ligera protección contra el tóxico oxidativo. Con respecto al potencial genotóxico, todos los ajos (crudo y procesados) no eran genotóxicos, con la excepción de la mayor concentración de ajo fresco. Exhiben efectos antigenotóxicos cuando los discos imaginales se tratan con peróxido de hidrógeno de genotoxina.

Los ensayos de longevidad en *Drosophila* produjeron una extensión significativa de los resultados de la vida útil en algunas de las concentraciones ensayadas de ajo fresco y varios tipos de ajo negro.

Los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro* para la citotoxicidad del ajo fueron esperanzadores. Todo el ajo estudiado indujo una disminución en el crecimiento de células de leucemia. Sin embargo, ningún tipo de ajo fue capaz de inducir proapoptótica fragmentación de ADN internucleosomal. Se concluye que el ajo negro procesado durante un corto período de tiempo tiene mejores propiedades que los de más larga fermentación e incluso más que el ajo fresco. Esto último podría tener consecuencias industriales y económicas. Tomando los datos fisicoquímicos y biológicos, los 13 días de envejecimiento de ajo negro ha demostrado ser el mejor nutracéutico.

ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) belongs to the liliaceae family and was widely cultivated and used as a spice by ancient civilizations: Greeks, Egyptians, Chinese and Indians. Numerous researches study the beneficial effects of garlic consumption on health. It has been recently reported to be effective in cardiovascular diseases, antihypertensive, anti-diabetic, and it possess many other biological activities antimicrobial, antioxidant, anticancer, anti-mutagenic and immunomodulator of prebiotic activities.

Garlic (*Allium sativum*) is a food ingredient used in our gastronomy in multiple dishes. The organoleptic characteristics of fresh air, itchiness and a long duration of its taste in the mouth mainly cause, in the part of the consumers, a rejection towards the products elaborated with the fresh one of the garlic, fundamentally. In this sense, there have been many ways to incorporate into the diet trying to avoid this intense spicy taste.

Black garlic has traditionally been produced in Asian countries and in recent years has been introduced in the countries of the West, such as Spain, Germany and Italy, and also in the US or Argentina. It is a key product for fundamental reasons: it has a better flavor of aroma than the fresh garlic and also has greater antioxidant capacity.

This growing demand for the product has been encouraged by the producing countries, including Spain, its production has been diversified by developing low garlic under controlled conditions, becoming also a star product due to the high price it reaches in the markets.

This research work has had as main objective the optimization of the manufacturing process at the same time as the physical-chemical and physiological characterization of the black garlic.

In general, the thesis work was focused on two tests about the production and characterization of some healthy properties of fresh garlic, comparing with different types of black garlic, with the chemical composition and nutraceutical characterization (antioxidants) of black garlic. Object to characterize evolutionary changes in the garlic during the manufacture of black garlic.

The trials of black garlic are varied and vary the plant material: garlic in heads or peeled, different varieties of garlic and different times of storage for the manufacture of a black, under conditions of temperature and constant humidity.

In both, manufacturing trials determinations were made for the physicochemical and antioxidant characterization of the garlic, in its different stages during the manufacture. In the first trial, peeled garlic and garlic heads were used and the samples were submitted to different temperatures, obtaining samples in the initial control and in three more moments during their manufacture. The L value (color), soluble solids content, pH, activity water (a_w), antioxidant capacity, polyphenols and total polyphenol content IPT Garlic heads of three different varieties and two different storage times were used as the plant material in the second production trial. The objective was to evaluate differences between varieties and storage times. Samples obtained from fresh garlic and three controls during the manufacturing were analyzed according to the following parameters: pH, acidity, °Brix, total sugars, antioxidant capacity polyphenol concentration. The results in the manufacturing trials allowed to conclude that black garlic differs from fresh garlic in its dark color, higher soluble solids values, lower pH and higher polyphenol concentration and antioxidant capacity. Likewise, in these tests it was evidenced that small variations of temperature in the process (72, 75 to 78 °C) influence the speed of change

As for the vegetable material used, it is concluded that the process of manufacturing black garlic using the previously peeled garlic does not differ from the black garlic resulting from the manufacture of black garlic with whole bulbs, traditionally used technique. The variations of the plant material in terms of varieties used or storage time of the fresh garlic used in the second test, influence the characterization of the product both physico-chemical and nutraceutical. In addition, this paper concludes that black garlic manufacturing processes in the industry exceed the times necessary to reach the maximum antioxidant power values in this product The third essay focused

on analyzing some of the health benefits of both fresh garlic and three types of black garlic, made in different aging times. Thus, products were characterized by toxicity, genotoxicity, longevity, cytotoxicity.

The results of this trial showed that all types of garlic were safe without toxicity and with 13 days of black garlic processing showed slight protection against oxidative toxicity. Respect to the genotoxic potential, all the garlic (raw and processed) were not genotoxic, with the exception of the higher concentration of fresh garlic. They exhibit antigenotoxic effects when imaging discs are treated with genotoxin hydrogen peroxide. *Drosophila* longevity trials produced a significant extension of the shelf life results in some of the tested concentrations of fresh garlic and various types of black garlic. The results obtained in in vitro experiments for the cytotoxicity of garlic were encouraging. All the garlic studied induced a decrease in the growth of leukemia cells. However, no type of garlic was able to induce proapoptotic internucleosomal DNA fragmentation. It is concluded that black garlic fermented for a short period of time has better properties than the longer fermentation and even more than fresh garlic. The latter could have industrial and economic consequences. Taking the physicochemical and biological data, the 13 days of black garlic aging has proven to be the best nutraceutical.

INTRODUCCIÓN

En la primera parte del presente capítulo, se desarrolla el marco teórico referencial de este estudio, empezando por un resumido recorrido histórico de la presencia de esta hortaliza en las diferentes culturas seguido de caracterización botánica y bioquímica del ajo fresco. A continuación, se describen los componentes bioactivos que dan al ajo la propiedad de alimento funcional y finalmente, se citan a los procesos de diversificación industrial entre los que destaca el ajo negro, objeto de estudio en este trabajo de tesis.

En la segunda parte del capítulo se describe las características generales que definen el ajo negro, su composición química puntualizando las notables diferencias con respecto al ajo fresco, los procesos de fabricación y los aspectos saludables de este producto descritos en recientes estudios de investigación.

Para concluir el capítulo, se plantea el problema que motiva este trabajo, se presenta la hipótesis y los objetivos generales y específicos que lo orientan.

1. MARCO TEÓRICO

1.1. EL AJO

1.1.1. Historia del ajo.

Desde muy antiguo, ha habido interés hacia los beneficios potenciales del ajo, siendo uno de los primeros ejemplos documentados de Plantas utilizadas para el mantenimiento de la salud y el tratamiento de enfermedades (Block 1985, Kahn 1996).

El uso del ajo como alimento y medicamento tiene orígenes antiguos en Asia. Ledezma & Apitz Castro (2006) indican que el origen tanto del ajo como de la cebolla es muy posiblemente Asia Central. Se estima que 2000 AC, el ajo se empleaba en China y formaba parte de la dieta diaria, especialmente consumido junto con la carne cruda (Kahn 1996, Moyers 1996). Otros registros que datan de esa época, sugieren que el ajo también se utilizó como conservante de alimentos.

Se habla del ajo en textos sagrados de distintas religiones como en la Biblia o el Corán (Block, 1985, Khan 1996). Hay evidencia de que en Grecia durante las primeras Olimpiadas, se utilizaba el ajo como alimento energizante para los atletas que competían (Lawson 1998).

En la India, el ajo se utilizó en lociones antisépticas para lavar heridas y úlceras (Block, 1985) así como remedio curativo en el siglo VI a.C. (García Alonso, 1998). En China y Japón se recomendó el té de ajo como remedio contra la fiebre, cefaleas, cólera y disentería, así como en la prevención de la trombosis en ancianos (Block, 1985). En la tradición tibetana, "los dioses del Cielo tuvieron una lucha y el dios perverso fue muerto por los tres dioses buenos. Su cuerpo precipitó en la tierra en mil pedazos y de cada uno de ellos brotó un ajo" (Ledezma & Apitz Castro 2006).

Sobre el ajo Hipócrates, describió: "...El ajo causa flatulencia, una sensación de calor en el pecho y una pesada sensación en la cabeza; excita la ansiedad y aumenta cualquier dolor que pueda haber presente. Sin embargo, posee la buena cualidad de aumentar la secreción de orina".

Entre los autores clásicos de la época, Aristófanes (siglos V-IV a.C.), en sus comedias, cita numerosas veces las cebollas y los ajos y relata en sus obras que los atletas comían ajo para mantener sus fuerzas en las competiciones olímpicas (Moyers, 1996). Posteriormente Virgilio (siglo I a.C.), habla del ajo como de un alimento tónico y le adjudica cualidades como que fortalece a los vendimiadores y preserva de las picaduras de las víboras (Ledezma & Apitz Castro, 2006).

Durante los años de la peste bubónica en Europa, el ajo fue utilizado para aumentar la inmunidad contra el organismo infeccioso responsable de tantas muertes. Varios textos relatan que los supervivientes de la peste eran frecuentemente aquellos que habían ingerido rutinariamente grandes cantidades de ajo.

Durante el siglo XVIII, los rusos utilizaron el ajo para tratar la influenza. Finalmente, el ajo sería conocido como "penicilina rusa". Los colonos americanos consideraban el ajo por su capacidad de

matar a los parásitos.

En el siglo XIX, Louis Pasteur finalmente demostró científicamente que el ajo contiene propiedades antibióticas. Su descubrimiento condujo a la iniciación de cientos de estudios que han fundamentado sus hallazgos. A finales del siglo XIX, el ajo era utilizado rutinariamente por los médicos como un tratamiento eficaz para el tifus, el cólera y la tos ferina. Fue altamente recomendado por los médicos y considerado como tratamiento básico para la infección.

A principios del siglo XX, la tuberculosis fue tratada con ajo y también se usó como un antibiótico / antiséptico para las heridas durante la Segunda Guerra Mundial.

Durante la década de 1950 los científicos chinos utilizaron el ajo para tratar con éxito la gripe. Posteriormente, los estudios occidentales encontraron que el ajo era un tratamiento eficaz para el resfriado común. El descubrimiento de la penicilina resultó en la clasificación del ajo como nada más que un remedio popular. Desafortunadamente, durante varias décadas su potencial medicinal ya no era tomado en serio por los científicos.

Durante las últimas décadas, el interés científico por el ajo ha aumentado drásticamente. En 1990, se celebró en Washington, DC, el Primer Congreso Mundial sobre la Importancia de los Constituyentes del Ajo.

En épocas próximas a nosotros se pueden encontrar consejos sobre la forma de consumo de estos bulbos. Así, según encontramos en la página web <http://www.etiquetasdefrutas.es> (2011), para evitar que el ajo produzca malestar estomacal, o repita después de las comidas, ingiérelolo con otros alimentos, picado o machacado. Además, es recomendable abrirlo por la mitad a lo largo y quitarle el germen o brote que contiene en su interior (algunos gastrónomos famosos lo llaman “rabia del ajo”). Se indican además algunos remedios caseros elaborados con ajo. Por ejemplo: el ajo cocido al horno, ablanda las callosidades dolorosas; si se hierve con leche, su efecto es positivo en los casos

de eccemas, tiñas y verrugas. Los masajes con jugo de ajo, para quienes corren riesgos de calvicie o pérdida del cabello, afirman el cuero cabelludo (Torija et al., 2013).

En resumen, en los últimos tiempos el ajo promete emerger una vez más, como un poderoso agente medicinal que sin duda afectará las prácticas de salud del siglo XXI.

1.1.2. Botánica del ajo

- Clase: *Monocotiledóneas*

-

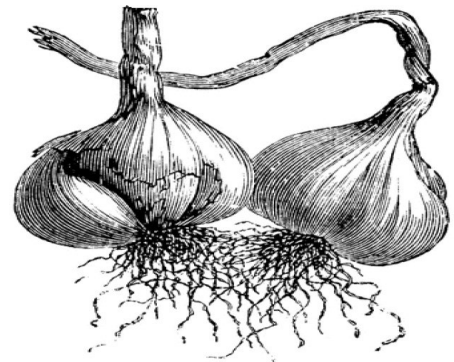
Orden: *Liliforme* • Familia: *Amaryllidaceae* (*Liliáceas*)

- Género: *Allium*

- Especie: *sativum*

- Nombre científico: *Allium sativum* L.

- Nombre común: *Ajo*



El género *Allium* agrupa a unas 600 especies, algunas de gran valor agrícola, como es el caso del ajo, la cebolla o el puerro, y otras son plantas ornamentales por su característica de tener flores espectaculares y ser muy resistentes al frío.

Junto con cebollas, puerros, cebollinos y chalotes, el ajo es un miembro de la familia del lirio. El nombre botánico para el ajo, el *allium sativum* puede haber sido derivado de la palabra celta todo lo que se refiere a "picante". La parte comestible de la planta de ajo crece bajo tierra y consiste en un bulbo cloved.

La planta del ajo posee raíces numerosas, simples, finas y en forma de mechón, que alcanzan poca profundidad en el suelo. Presenta un tallo blando y liso de unos 40 cm de altura, que asoma por el

centro de las hojas. Se trata de un tallo hueco y rollizo. De él van saliendo las hojas, de forma alargada y plana, que se van estructurando a lo largo del tallo de forma alternada. Al final de éste aparecen las flores de color rosado o verde que se agrupan en umbelas. El aprovechamiento del cultivo es el bulbo subterráneo (cabeza de ajo), formado por dientes unidos por su base alrededor del tallo y recubiertos por membranas o túnicas de color blanco o morado en varias tonalidades, según la variedad.

El ajo es una de las principales hortalizas cultivadas en el mundo, debido a las propiedades culinarias, medicinales e insecticidas que posee. Estos beneficios atribuidos al ajo y sus preparaciones, están estrechamente ligados a los compuestos químicos que presenta.

1.1.3. Composición bioquímica del ajo

En la composición bioquímica del ajo fresco existen más de 100 compuestos biológicamente activos. Están presentes los carbohidratos, compuestos azufrados, proteínas, fibras, aminoácidos libres, compuestos fenólicos, polifenoles y fitoesteroles. Tiene altos niveles de fósforo, potasio, azufre, zinc, moderados niveles de selenio y germanio y vitaminas A y C y bajos niveles de calcio, magnesio, sodio, hierro, manganeso y vitaminas del complejo B (*Florencio Greco, M, 2010*).

Tiene un contenido de agua relativamente bajo (alrededor del 65%), con la mayor parte del peso seco que comprende fructooligosacáridos, seguido de compuestos de azufre, proteína, fibra y aminoácidos libres (*Rahman & Lowe 2006*).

Al igual que con las cebollas, el micronutriente principal en el ajo es la vitamina C. Sin embargo, también es evidente que el ajo contiene otras vitaminas, particularmente B₆, que está presente en niveles altos, así como un surtido de minerales en cantidades pequeñas pero útiles.

Entre los compuestos bioactivos presentes en el ajo fresco destacan los siguientes grupos:

- Compuestos organosulfurados

- Fenoles
- Carbohidratos

Compuestos organosulfurados

Entre las características más destacadas del ajo se encuentra su aroma y debido a ello estos alimentos se utilizan como condimento en la cocina. Los agentes responsables del olor y sabor son numerosos compuestos azufrados que aunque no desprenden ningún olor cuando el bulbo está entero, sí lo hacen una vez que se trocea o manipula debido a una serie de reacciones enzimáticas (Muñoz Quezada et al., 2010).

El componente mayoritario es la alíina (+)-S-alilcisteína-sulfóxido, sustancia inodora e inestable que da lugar a la alicina tras una acción enzimática. La alicina fue denominada así por Cavallito quien la descubrió junto a sus colaboradores en 1944 cuando trabajaban con ajo. Se trata de un compuesto inestable. Los subproductos de la descomposición de la alicina son el piruvato y el amoníaco (Block, 1985). Las cantidades de ácido pirúvico y amoníaco producidos son equivalentes a las cantidades de sustrato consumidos (aliina), por lo que en la actualidad se utiliza la cuantificación de ácido pirúvico para medir la pungencia e indirectamente y cualitativamente la concentración del sustrato precursor (García Gómez & Sánchez Múñiz, 2000; Raigón, 2006, Rodríguez, 2009; Sanz Pérez, 2009; Espinoza Cáceres et al., 2010).

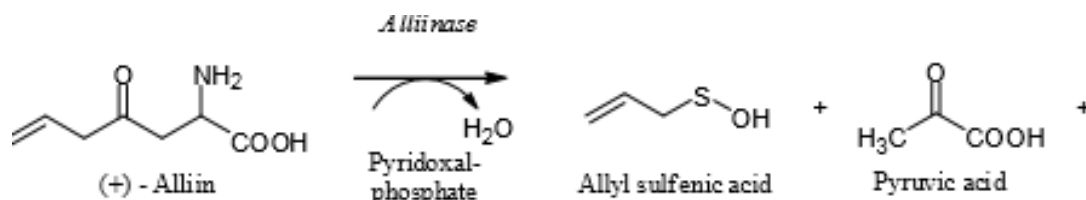


Figura 1. Transformación enzimática de la aliina en ácido allyl sulfénico (Dusica et al., 2011).

El ácido allyl sulfénico es inestable y muy reactivo a temperatura ambiente, condensándose dos moléculas del mismo dando lugar a una molécula de alicina y a liberación de una molécula de agua

A temperatura ambiente, estas transformaciones enzimáticas se producen en 10-15 minutos. El valor de pH óptimo para la actividad catalítica de alilinasa es de 6,5, mientras que la temperatura óptima es de 33 °C (Dusica et al., 2011).

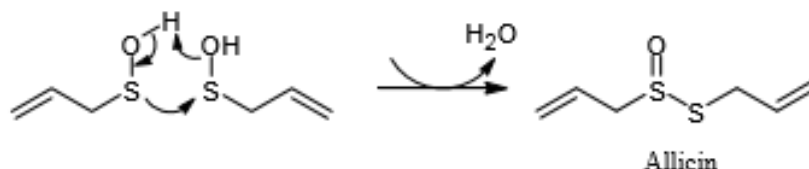


Figura 2. Biosíntesis de la aliina (Dusica et al., 2011).

Se piensa que la alicina, un producto de descomposición intermedio de la aliina, es la responsable del olor del ajo fresco y se descompone en otros compuestos, incluyendo sulfuro de dialilo, disulfuro de dialilo y trisulfuro de dialilo o, en presencia de aceite, ajoeno o Vinil ditiinas (Rahman 2003, Higdon 2005)

Fenoles

Otro grupo de compuestos bioactivos de los bulbos que nos ocupan son los polifenoles, entre los que destacan los flavonoides. Entre los alimentos que aportan en mayor proporción de estos compuestos se encuentran el té negro, las cebollas, las manzanas, la pimienta negra, bebidas alcohólicas como el vino y la cerveza.

Los principales flavonoides del ajo son los flavonoles, la miricetina y la apigenina y, en marcado contraste con las cebollas, sólo los bajos niveles de quercetina (Lanzotti,2006). Los compuestos fenólicos son de interés en gran parte debido a su actividad antioxidante.Vinson et al. (1998) encontraron que el ajo tenía los terceros niveles más altos de fenoles totales de las 23 hortalizas communes por ellos estudiadas.

Carbohidratos

En el grupo de carbohidratos presentes en el ajo, se encuentran los fructanos (Torijal et al., 2013)

Los fructanos son compuestos que se incluyen en la fracción hidrocarbonada de estos bulbos. Son polímeros de fructosa, derivados de la molécula de sacarosa. Los fructanos de las plantas tienen diferentes estructuras y longitudes de cadena. Entre ellos, los fructanos con un grado de polimerización de 2 a 10 son comúnmente llamados fructooligosacáridos (Ulloa et al., 2010).

1.1.4. Propiedades saludables del ajo

Los estudios clínicos revelan una estrecha relación entre los hábitos alimenticios y la aparición de las enfermedades. Así, de manera general, las dietas altas en grasa pueden aumentar el riesgo de enfermedades del corazón y algunas formas de cáncer. Por el contrario, el aumento de la ingesta de frutas, verduras, hierbas y algunos de sus componentes, reduce los riesgos e incluso puede prevenir algunas enfermedades.

Los alimentos funcionales pueden ser de origen animal y/o vegetal. Los últimos destacan por su alto contenido de compuestos activos, además de aquellos que son considerados nutrientes (p.ej., vitaminas y minerales). En particular, se trata de compuestos fisiológicamente activos, producto del metabolismo secundario de vegetales, también denominados fitoquímicos. En función de sus estructuras químicas, se los agrupa como: terpenos, fenoles, alcaloides y compuestos azufrados, que ejercen efectos positivos sobre la salud humana (Crozier et al. 2006).

Algunos alimentos han sido estudiados ampliamente por su potencial efecto beneficioso sobre la salud. Se ha demostrado que varios alimentos del *grupo Alliums* reducen los riesgos y / o modulan el metabolismo para favorecer la prevención de enfermedades.

El ajo ha sido considerado en numerosas culturas un alimento con cualidades terapéuticas excepcionales (Tsai et al., 2012). El estudio de las propiedades beneficiosas para la salud del ajo

fresco ha sido objeto de investigación en más de 3000 trabajos científicos (Amagase, 2001) dando a conocer los efectos preventivos e incluso curativos en el desarrollo de numerosas enfermedades en relación entre el consumo de dietas ricas en alimentos con compuestos organosulfurados como es el caso del ajo (*Omar and Al-Wabel, 2010*) y la prevención de ciertos tipos de cáncer ha sido descrita en numerosas publicaciones (*Bayan et al 2014*).

Hoy en día, tanto la tradición científica como herbológica apoyan el hecho de que el ajo, en sus diversas formas, puede proporcionar beneficios extraordinarios para la salud. Incuestionablemente, puede reducir significativamente el riesgo de enfermedades cardiovasculares y ciertos tipos de cáncer. Tomar el ajo, en ciertas dosis, puede ayudar a proteger las células humanas de la oxidación, los radicales libres y ciertos tipos de radiación. El ajo es un refuerzo eficaz del sistema inmunológico y tiene propiedades anti-bacterianas, anti-virales y anti-hongos. Otros efectos positivos sobre la salud son mencionados por Rahman (2003) quien cita una serie de estudios adicionales relacionados con las propiedades protectoras del ajo en relación con trastornos asociados con el envejecimiento, incluyendo: mejorar el sistema inmunológico, prevenir las cataratas y la degeneración macular, prevenir la artritis, mejorar la circulación y disminución de arrugas de la piel.

El ajo es una mezcla concentrada de fitoquímicos, que probablemente interactúan y tienen efectos sinérgicos. Como se mencionó anteriormente, se han reportado una serie de efectos terapéuticos del ajo, incluyendo muchos relacionados con las principales enfermedades crónicas, enfermedades cardiovasculares y cáncer.

Los compuestos organosulfurados se han estudiado en los últimos años y han despertado gran interés por su efecto protector ante enfermedades cardiovasculares, dado que disminuyen los niveles plasmáticos de colesterol y triglicéridos, actúan como antiagregantes plaquetarios e hipotensores. Los efectos cardiovasculares de los compuestos organosulfurados, específicamente los del ajo se

encuentran muy bien documentados: disminuyen el colesterol total y las LDL de forma dosis dependiente (García Gómez & Sánchez Múñiz, 2000; Cavagnaro et al., 2007; Mukheriee et al., 2009; Reinhart et al., 2008; González et al., 2009 y Muñoz Quezada et al., 2010).

Los compuestos fenólicos y azufrados del ajo actúan sinérgicamente bloqueando la actividad del oxígeno reactivo sobre las proteínas, lípidos y ADN, brindándole al ajo propiedades antioxidantes. Individualmente los compuestos azufrados participan en actividades hipolipémicas, antimicrobianas, antiparasitarias, antifúngicas, antibacteriales, anticancerígenas, hepatoprotectivas, antitrombóticas, protectores cardiovasculares (Ezpinoza Cáceres et al., 2010).

Se caracterizan por su importante papel como agentes prebióticos, incluidos dentro de la fracción fibra de los alimentos, papel que se caracteriza porque facilitan el desarrollo de la flora intestinal y previenen numerosas enfermedades (Torija Isasa, 2011).

Las especies reactivas de oxígeno (ROS), o radicales libres, han sido implicadas en la mediación de diversos procesos patológicos tales como cáncer, isquemia, enfermedades inflamatorias, diabetes y aterosclerosis. (Amagase 2006).

Los estudios sugieren que el ajo puede trabajar reduciendo el ROS o interactuando con ellos para minimizar el impacto negativo en el cuerpo. Sin embargo, el grado de eficacia antioxidante de diversos preparados de ajo difiere según las variaciones en las estructuras químicas y el procedimiento de normalización (Amagase 2006).

Los principales antioxidantes presentes en el ajo son ciertos compuestos de organosulfurados, algunos compuestos fenólicos. y la vitamina C. Los antioxidantes tienen una serie de efectos protectores del cáncer, incluyendo la neutralización de los radicales libres, la protección del ADN contra el daño y la asistencia al mantenimiento de la función celular normal. Se han reportado niveles altos a muy altos de actividad antioxidante para el ajo en varios estudios (Cao et al., 1996, Vinson et al., 1998, Chun et al., 2005, Ninfali et al., 2005).

Cao et al. (1996) expresan la capacidad antioxidante en μmol equivalentes trolox/ g de materia fresca; los datos que ofrecen para ajo y cebolla son de $19,4 \pm 3,1$ para el primero y de $4,5 \pm 0,5$ para la segunda.

Existe evidencia de que los compuestos organosulfurados pueden estimular la síntesis del glutathione antioxidante endógeno. Rahman & Lowe (2006) revisaron siete estudios relacionados con el efecto del ajo sobre el estrés oxidativo. Es difícil comparar los resultados a medida que se usaron diferentes tipos de ajo, como el extracto de ajo envejecido, las perlas de ajo y las tabletas de ajo y aunque los resultados se mezclaron, la mayoría (5 de 7) mostraron mejoras en los marcadores de estrés oxidativo.

1.1.4.1. Efectos cardioprotectores

De especial interés, la Organización Mundial de la Salud se refirió a las ECV (Enfermedades Cardio Vasculares) como una epidemia mundial desatendida, y destacó que se encuentran presentes en todos los países, con excepción de algunos muy pobres, y alertó además que representan una amenaza seria a nivel de salud pública, con gran impacto sobre el desarrollo social y económico. Los factores de riesgo que la agravan sirven como indicadores del estado de salud poblacional, y cinco de ellos guardan estrecha relación con enfermedades no transmisibles, como son la hipertensión arterial, el tabaquismo, el consumo de alcohol, la hipercolesterolemia, la obesidad o el sobrepeso (Camargo and Manucha, 2017)

Entre los fitoquímicos presentes en los alimentos que evidencian propiedades beneficiosas en relación con la salud cardiovascular —y en particular con la reducción de los niveles del colesterol— se pueden mencionar componentes tales como la proteína de soja, fibra soluble, vitaminas E, C, β -caroteno, compuestos fenólicos y los compuestos organoazufrados (Hasler, 2002)

Estudios epidemiológicos han demostrado que el consumo de ajo puede proteger contra el

desarrollo de enfermedades cardiovasculares y varios estudios in vitro han comprobado que esto se logró mediante la atenuación de varios de los factores enumerados anteriormente (Rahman & Lowe 2006; Higdon, 2005).

Una revisión reciente (Cicero and Colletti, 2015) ha reunido evidencias que describen protección cardiovascular en pacientes asociada al consumo de compuestos tales como catequinas, flavonoides y aliina, entre otros.

Los efectos benéficos asociados al consumo de los alimentos del grupo Allium, son atribuidos a compuestos encontrados en las plantas cuando el tejido se halla intacto, odorantes formados durante la rotura de los tejidos, sustancias derivadas de reacciones posteriores, o bien productos de degradación metabólica de estos 3 tipos de compuestos (Block, 1992).

Para comprender los efectos positivos en salud cardiovascular conviene referir que la biosíntesis de los organosulfurados se inicia cuando el azufre es absorbido del suelo, luego experimenta una serie de transformaciones metabólicas para generar diversos productos a posteriori almacenados como γ -glutamil-péptidos, y que más tarde se biotransforman en alquencil-cisteín-sulfóxidos (ACSO), también llamados compuestos precursores del flavor. Cuando el tejido de ajo fresco es dañado, la enzima alinasa (situada en las vacuolas) actúa sobre los ACSO (presentes en el citoplasma celular), liberando los tiosulfatos, siendo en el ajo la alicina (dialil tiosulfato) el producto que se encuentra en mayor proporción (65-75%) (fig. 3A). En consecuencia, muchas de las propiedades beneficiosas para la salud cardiovascular son atribuidas a este compuesto mayoritario, que a su vez se descompone para originar otra serie de productos como polisulfuros (mono, di y tri-sulfuros), ajoenos y vinilditiinas, que también evidencian propiedades protectoras. Además, múltiples estudios refieren que los efectos positivos sobre salud cardiovascular del ajo se observan cuando es consumido fresco (Gonzalez et al , 2009) y/o cocido (Cavagnaro et al., 2007).

En una reciente trabajo de Camargo y Manucha (2017) se recopilan numerosos estudios que

refieren los efectos positivos del consumo de ajo y/o sus preparaciones sobre los perfiles de lípidos en sangre, incluyendo una reducción en el colesterol total, el LDL, y un aumento en los niveles de HDL y triglicéridos (Peleg et al. 2003, Ashraf et al. 2005). En tanto que un estudio conducido por Gardner et al. 2005 no constató beneficios equivalentes en pacientes adultos con hipercolesterolemia moderada.

Un estudio realizado ppor Zhang et al. (2006) encontró que la suplementación de ajo a largo plazo no tuvo ningún efecto sobre los perfiles lipídicos.

De Luis & Aller (2008) describen que el consumo de cinco gramos de ajo dos veces al día durante 42 días puede disminuir el colesterol total y los triglicéridos, pero indican que la mayoría de los estudios se han realizado en animales.

En varios ensayos se ha demostrado que el ajo y los compuestos derivados del ajo inhiben in vitro las enzimas implicadas en la síntesis de colesterol y ácidos grasos. Los resultados de los ensayos clínicos han sido mixtos. De los 25 ensayos clínicos revisados por Rahman & Lowe (2006), 14 no mostraron efecto del ajo sobre los niveles de colesterol, aunque 11 mostraron una reducción en el colesterol sérico. Sin embargo, los autores discutieron disparidades en la metodología de los estudios que no mostraron efectos, con diferencias en la población de estudio y la forma de ajo utilizada.

Se han identificado una serie de sapogeninas (la base de aglicona) y saponinas en el ajo, (Matsuura 2001; Lanzotti 2006). Matsuura (2001) describió que el efecto reductor del colesterol observado en este estudio en animales fue atribuible particularmente a saponinas de spirostanol.

Algunos de los compuestos presentes en el ajo pueden reducir significativamente el aglomerado plaquetario y la formación de coágulos. Se ha propuesto un mecanismo relativo a la inhibición de la movilización del calcio. El ajo en varias formas dadas a sujetos en varios estados de salud tuvo un

efecto positivo en la inhibición de la agregación plaquetaria. La fibrinólisis (la ruptura de los coágulos sanguíneos) también se mejora con el ajo.

Un estudio demostró que mejoró la fluidez de los glóbulos rojos aislados de ratas hipercolesterolemia suplementadas con ajo (Kempaiah & Srinivasan 2005).

Se demostró que el zumo de ajo tenía un efecto favorable sobre la frecuencia cardíaca, aunque a niveles más altos había un efecto perjudicial (Rahman & Lowe 2006). Estudios revisados por Rahman & Lowe (2006) mostraron resultados mixtos relacionados con la presión arterial. Seis de los nueve estudios revisados mostraron una reducción de la presión arterial, aunque 3 no lo hicieron. Nuevamente el tipo de ajo difería entre los estudios. Un metaanálisis anterior concluyó de manera similar que el consumo de ajo tenía efectos insignificantes sobre la presión sanguínea (Ackermann et al., 2001). La suplementación con ajo aumentó el flujo sanguíneo periférico en sujetos sanos y mejoró la elasticidad de los vasos sanguíneos en sujetos de edad avanzada.

La inflamación está implicada en la etiología de la aterosclerosis (endurecimiento de las arterias). Se ha encontrado que el ajo y sus compuestos constitutivos inhiben la actividad de enzimas inflamatorias, así como inhiben la actividad de otros componentes implicados en el proceso de inflamación (Higdon, 2005).

1.1.4.2. Actividad protectora del cáncer

En 1990, el Instituto Nacional del Cáncer de Estados Unidos inició el Programa de Diseño de Alimentos para determinar qué alimentos desempeñaron un papel importante en la prevención del cáncer (Dahanukar y Thatte, 1997). Concluyeron que el ajo puede ser el alimento más potente que tiene propiedades preventivas del cáncer.

Se ha informado que el ajo y sus constituyentes inhiben el desarrollo de tumores inducidos químicamente en el hígado (Kweon et al., 2003), colon (Knowles y Milner, 2003), vejiga (Lau et

al., 1986), la glándula mamaria (Amagase y Milner, 1993), el esófago (Wargovich et al., 1988), el pulmón (Sparnins et al., 1986), la piel (Nishino et al., 1989) y estómago (Wattenberg et al., 1989) tanto en estudios con roedores como en seres humanos.

Se ha demostrado que el trisulfuro de dialilo (DATS), un compuesto organosulfuro aislado del ajo, tiene actividad anticancerosa tanto en investigaciones in vitro como in vivo. La citotoxicidad de DATS hacia las células epiteliales de próstata se redujo en comparación con las células de cáncer PC-3 (Borkowska, 2013).

Se ha demostrado que el ajoene, un compuesto rico en azufre soluble en aceite estable y un compuesto natural derivado del ajo, induce la apoptosis en células leucémicas además de las otras células sanguíneas de pacientes leucémicos.

Además, la alicina inhibe la proliferación de células endometriales mamarias humanas y células de cáncer de colon. La inhibición del crecimiento se acompaña de una acumulación de las células en la fase WIG1 y G2IM del ciclo celular. Por lo tanto, la alicina es también responsable del efecto antiproliferativo de los derivados del ajo. El sulfuro de dialilo y el disulfuro de dialilo, inhiben la actividad de la arilamina, la Nacetiltransferasa y el ADN de 2 aminofluoreno en las células de leucemia promielocítica humana (Lin et al., 2002). Se sugirió la reducción del riesgo de algunas neoplasias malignas por el consumo de plantas enriquecidas en selenio, como el ajo (Finley, 2003)

Los resultados con estudios en animales sobre una gama de diferentes tipos de cáncer son prometedores, pero se necesitan más investigaciones antes de que se pueda afirmar una eficacia similar para los cánceres humanos.

1.1.4.3.Efectos protectores del cerebro

Se cree que el estrés oxidativo está implicado en muchos de los procesos que contribuyen a la pérdida de la función cerebral, como la enfermedad de Alzheimer y las demencias. Esto puede tener

una multitud de efectos, incluyendo el deterioro vascular a través de la aterosclerosis, alteración de la estructura y función celular, inactivación de proteínas, daños mitocondriales y del ADN y reticulación de colágeno (Rahman 2003). Así, la fuerte actividad antioxidante del ajo podría tener un papel protector. Sin embargo, la mayoría de los estudios sobre este tema involucran el uso de extracto de ajo envejecido, lo que muestra una promesa considerable, pero cuya mayor actividad bioactiva, S-allylcysteine, no existe en el ajo fresco (Higdon 2005).

1.1.4.4. Diabetes

El efecto beneficioso del ajo sobre la diabetes mellitus se atribuye principalmente a la presencia de compuestos volátiles de azufre, como alicina, disulfuro de dialilo, trisulfuro de dialilo, sulfuro de dialilo, S-alilcisteína, ajoeno y alil mercaptano (Bayan et al 2014). Los extractos de ajo han sido reportados como eficaces para reducir la resistencia a la insulina (Padiya y Banerjee, 2013).

Muchos tratamientos étnicos para la diabetes implican el uso de especies *Allium*. Varios estudios animales e in vitro han sugerido mecanismos por los cuales esto se consigue. Por ejemplo, se demostró in vitro que ciertos compuestos de ajo protegían eritrocitos humanos y plaquetas contra la oxidación inducida por glucosa y protegían LDL nativo contra la oxidación y la glicación (Chan et al., 2002). Un estudio adicional identificó papeles específicos para diversos compuestos bioactivos, encontrando que el sulfuro de dialilo y el disulfuro de dialilo mostraron mayores efectos retardadores de la oxidación que los compuestos que contienen cisteína, aunque estos últimos fueron más efectivos para retrasar el deterioro glicógeno (Huang et al., 2004).

1.1.5.5. Actividad antimicrobiana

El ajo ha sido reconocido por sus efectos antibacterianos y antifúngicos y recientemente la búsqueda de conservantes naturales ha llevado al interés en su potencial para prevenir la contaminación microbiana en los alimentos.

La actividad antibacteriana del ajo es ampliamente atribuida a la alicina. (Bayan et al 2013) Se sabe que la alicina tiene actividad modificadora de sulfhidrilo (Wills, 1956) y es capaz de inhibir las enzimas sulfhidrilo. La cisteína y el glutatión contrarrestan la actividad de tiolación de la alicina. Se ha demostrado que el extracto de ajo y la alicina ejercen efectos bacteriostáticos sobre algunos enterococos resistentes a la vancomicina. Se observó un sinergismo inhibitor cuando se usó en combinación con vancomicina (Jonkers et al., 1999).

Se ha informado que inhibe *Aerobacter*, *Aeromonas*, *Bacillus*, *Citrella*, *Citrobacter*, *Clostridium*, *Enterobacter*, *Escherichia*, *Klebsiella*, *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Micrococcus*, *Mycobacterium*, *Proteus*, *Providencia*, *Pseudomonas*, *Salmonella*, *Serratia*, *Shigella*, *Staphylococcus*, *Streptococcus* y *Vibrio* (Sivam 2001).

Dos estudios también han demostrado tener potencial para proteger contra las infecciones por *Helicobacter pylori* y se postuló que este efecto podría ser responsable de la asociación inversa entre el consumo de especies de *Allium* y el cáncer gástrico, que está relacionado con la infección por *H. pylori* (Sivam 2001).

Otro estudio encontró que la alicina mostró efectos prometedores en la prevención y el tratamiento de la malaria (Coppi et al., 2006). Se ha demostrado que varios componentes de organosulfuro, pero particularmente derivados de alicina, desempeñan un papel importante en la actividad antimicrobiana del ajo. Sin embargo, también se demostró que los extractos de polifenoles del ajo tienen altos efectos inhibitorios contra las bacterias *Staphylococcus aureus* y *Salmonella enteritidis* y contra tres hongos, *Aspergillus niger*, *Penicillium cyclopium* y *Fusarium oxysporum* (Benklebia et al., 2005).

1.1.6. Factores a considerar que afectan los beneficios para la salud

Biodisponibilidad

Aunque se han atribuido diversos efectos sobre la salud a los compuestos derivados de la alicina, su absorción no se conoce bien y no está claro cuál de ellos o sus metabolitos llegan a los tejidos diana y ejercen el efecto. Se piensa que la alicina y sus derivados se metabolizan rápidamente, ya que nunca se han identificado en sangre humana, orina o heces. Se ha propuesto que el sulfuro de metilo alílico en la respiración puede ser indicativo de la biodisponibilidad de compuestos derivados de alicina ya que las concentraciones en el aliento humano se correlacionan con las cantidades consumidas (Higdon 2005).

Cocción / procesamiento.

Muchos de los componentes bioactivos del ajo no están presentes como tales en el diente de ajo intacto, sino que son catalizados por enzimas después de cortar, triturar, masticar o o procesamiento celular. La enzima alinasa, que está implicada en la formación de alicina, es inactivada por calor, por lo que el bioactivo deseable no se forma si el calentamiento tiene lugar antes de la interrupción celular.

A veces se recomienda que el ajo triturado o picado se deje reposar por lo menos 10 minutos antes de cocinar, para permitir tiempo suficiente para que estas reacciones tengan lugar (Higdon 2005). Un estudio reciente también encontró que los compuestos bioactivos en el ajo, junto con su actividad antioxidante (medida de acuerdo con cuatro métodos diferentes), disminuyeron significativamente después de cocinar durante 20 minutos a 100 ° C (Gorinstein et al., 2005).

1.1.7. Productos derivados del ajo

Además del ajo crudo, actualmente se comercializan diferentes productos derivados del mismo como son: ajo deshidratado, aceite de ajo, aceite de ajo macerado, extracto de ajo envejecido (AGE) y el último producto en desarrollarse, el ajo negro.

Es importante destacar que la composición fisico-química y fisiológica de estos preparados puede variar significativamente dependiendo del método utilizado para su fabricación. Se deberá estudiar la influencia de los diferentes factores que influyen principalmente en la cantidad de antioxidantes (alicina y SAC fundamentalmente) que están presentes en el producto final así como la biodisponibilidad. A continuación se detallan algunas características de los diferentes productos que actualmente se comercializan:

- **Jugo:** El jugo de ajo se puede tomar para trastornos digestivos, enfermedades infecciosas y para la aterosclerosis.
- **Cápsulas:** El ajo en polvo se puede tomar en cápsulas y se puede comprar en forma desodorizada.
- **Perlas:** Las perlas son aceite de ajo capsulizado que se han desodorizado y se utilizan a veces como una alternativa a las cápsulas.
- **Extracto de ajo envejecido.** Los dientes de ajo frescos cortados en rodajas se empapan en una solución etanol / acuosa, hasta 20 meses a temperatura ambiente. Durante este proceso, la alicina se convierte en gran medida en compuestos de organosulfuro solubles en agua, especialmente S-alilcisteína y S-alilmercaptocisteína (Amagase et al., 2001; Higdon 2005; Borek 2006). Este proceso desodoriza el ajo, pero el extracto es rico en antioxidantes y ha demostrado efectos prometedores en la prevención de una serie de enfermedades importantes (Borek 2006) . Considerado por algunos como una forma superior de ajo ha sido estudiado en más de 400 publicaciones. Muy alta concentración en antioxidantes, esencialmente SAC.

El último producto derivado del ajo en aparecer ha sido el Ajo Negro., objeto de estudio de esta Tesis Doctoral. A continuación se realiza una revisión bibliográfica de las características

generales del ajo negro, su composición, fabricación así como todos sus potenciales efectos saludables descritos en trabajos clínicos hasta la fecha.



1.2. EL AJO NEGRO

A pesar de los innumerables efectos saludables a los que puede contribuir el consumo de ajo según se ha descrito en la primera parte del presente trabajo, excepto en países como China y Japón, el consumo de ajo está descendiendo en los últimos años (Riu and Kang, 2017). La causa de este descenso parece ser el fuerte olor y sabor que produce cuando se consume fresco (Tanamai et al., 2004) así como las molestias gastrointestinales que pudiera causar. El ajo negro aparece recientemente en los mercados como producto innovador que solventa en gran medida este gran problema, ya que su característica principal es que carece del sabor pungente característico en el ajo fresco.

Hay mucha controversia en cuanto al origen del ajo negro. Se habla de que el ajo negro es producto ancestral, consumido frecuentemente en muchos países asiáticos como Corea, Taiwán, Japón, o Tailandia que fue introducido en los mercados hace unos diez años (Kimura et al 2017). La mayoría de las versiones con respecto a su aparición describen que el ajo negro ganó popularidad en Corea después de una investigación en la que se mostraban sus beneficios saludables. En dicha publicación, Jinito Sasaki, profesor de la Universidad de Hirosaki, publicó en 2007 un trabajo describiendo que el ajo negro reducía las células cancerosas en el ratón. Cuando la misma investigación se realizó con ajo blanco, no tuvo el mismo resultado. A raíz de esta publicación, surgió un enorme interés hacia este producto, tanto en los amantes de la cocina como desde el punto de vista de las terapias saludables.

Actualmente, el proceso de fabricación y comercialización del ajo negro se ha extendido hacia otras zonas productoras de ajo como China, EEUU, Canadá, Argentina y Europa. En España, el ajo negro está siendo fabricado por varios operadores económicos, en Andalucía y Castilla la Mancha,

comercializando este producto tanto a nivel nacional como internacional y con destino a mercados naturalistas y/o relacionados con la gastronomía.

El ajo negro es un producto elaborado a partir del ajo fresco (*Allium Sativum* L.) mediante un proceso tecnológico a temperatura y humedad controlada durante un período prolongado de tiempo (ver detalles en apartado Fabricación del ajo negro). A medida que el ajo evoluciona poco a poco hasta llegar a aspecto final, numerosos compuestos del ajo fresco se transforman en toda una nueva gama de compuestos diferentes, convirtiéndose en un producto atractivo tanto para su uso terapéutico como culinario.

Aunque el proceso es descrito consistentemente como "fermentación", en realidad no tiene nada que ver con la fermentación microbiana propiamente dicha, ya que la transformación no implica un proceso microbiano siendo la degradación enzimática y la reacción de Maillard específicamente las responsables de la caramelización de los azúcares, color oscuro y el perfil de sabor complejo característico de este producto.



Foto 1. Corte transversal de bulbo de ajo negro al finalizar su fabricación (Fuente propia)

Algunas de las características más destacadas del ajo negro que lo diferencian del ajo fresco son:

- I. El ajo negro se fabrica mediante un proceso natural de calentamiento, sin añadir ningún aditivo o coadyuvante para conseguir el producto final.
- II. Se caracteriza por una ausencia casi total del sabor a ajo o pungencia característico en el ajo fresco, detectable una vez se muerde o tritura.
- III. Los cambios principales en la caracterización fisico-química del producto: descenso del pH y a_w a la vez que aumentan los azúcares totales, los valores cromáticos, la acidez y los sólidos solubles (°Brix).
- IV. Aumento de la capacidad antioxidante al compararlo con el ajo fresco.
- V. La composición nutricional en cuanto a compuestos bioactivos varían significativamente. El proceso de envejecimiento aumenta la concentración de flavonoides, piruvato, fenol total, SAC, azúcares libres y minerales (Ryu and Kang, 2017) (Ver apartado Principales componentes químicos en el ajo negro).
- VI. Se considera un alimento con alto contenido en aminoácidos. De los 20 aminoácidos contiene 18 y de los 8 esenciales los aporta todos (Calderón, 2015).

1.2.1. Fabricación y caracterización del ajo negro

El ajo negro es un producto elaborado a partir del ajo fresco (*Allium Sativum* L.) mediante un proceso industrial a temperatura y humedad controlada durante un período prolongado de tiempo. Las temperaturas varían 40 a 90 °C, la humedad relativa 80 a 95% y los tiempos oscilan entre 10 y 40 días, dependiendo de la intensidad del tratamiento (Lee et al., 2009; Jeong et al 2013; Wang et al 2010; Lee et al 2011; Kang et al 2016; Sasaki et al 2007; Bae et al 2013; Jang et al 2008; Kim et al 2011; Kim et al 2013; Kim et al 2017; Seo et al 2009).

En un trabajo reciente publicado por Riu and Kang (2017) se cita como proceso general de

fabricación de ajo negro el sometimiento del ajo a procesos de tratamiento térmico de múltiples etapas con tiempos de algo más de 10 días (véase la Figura 3).

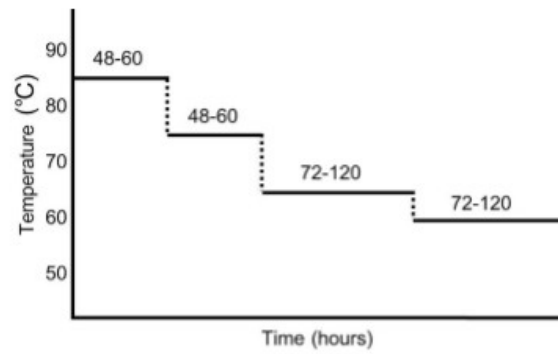


Figura 3. Fabricación de ajo negro siguiendo la Patente N.º 10-2012-0058110. El ajo fresco fue incubado durante 48-60 horas a 80-90°C, 48-60 horas a 70-80°C, 72-120 horas a 60-70°C y finalmente 72-120 horas a 55-60°C. (Riu and Kang, 2017)

Es conocido que el período de envejecimiento del ajo es más corto a temperaturas más altas. En el caso del proceso de envejecimiento a 70 °C, la velocidad de envejecimiento es dos veces más rápida que la de 60 °C. Según la evaluación sensorial, la calidad de ajo negro es mejor y su color negro es homogéneo entre 70 °C y 80 °C. A pesar de que el ajo negro se produce más rápido a 90 °C, produce gustos no ideales, como los gustos amargos (Zhang et al., 2016). En el caso del proceso de envejecimiento a 60 °C, el color del ajo no era completamente negro; Por lo tanto, 60 °C tampoco es una condición ideal para el proceso de envejecimiento.

1.2.2. Composición química del ajo negro

Recientes estudios describen los cambios producidos en la composición química del ajo fresco al transformarse en ajo negro (Choi et al. 2014, Bae et al., 2015, Riu and Kang 2017, Kimura et al., 2017).

En el calentamiento se producen varios cambios en el flavor, olor y contenidos en nutrientes. Así, el tratamiento térmico permite las reacciones del pardeamiento no enzimático o reacción de Maillard, la caramelización y oxidación química de los fenoles. Así, en el ajo negro aparecen un elevado número de compuestos bioactivos, como son los fenoles, flavonoides, piruvato, tiosulfato, S-allylcysteine (SAC), y S-allylmercaptocysteine (SAMC) (Shin et al., 2014, Cha et al., 2012; Imai et al., 1994; Lee et al 2010; Shin et al., 2008; Choi et al., 2008).

Como se ha mencionado anteriormente, el compuesto precursor del olor y sabor del ajo fresco es la S- Alil-cisteina-sulfóxido (aliina); cuando el ajo es cortado o machacado la enzima alinasa actúa sobre este compuesto generando alicina, ácido pirúvico y amoniaco. Sin embargo, en el ajo negro la alicina se transforma en otros compuestos por lo que desaparece el olor y sabor pungente. Este hecho se debe a cambios en la alicina compuesta, que es responsable del olor acre, en compuestos antioxidantes solubles en agua, tales como S-alilcisteína (SAC), tetrahidro-β-carbolinas, alcaloides

biológicamente activos y compuestos similares a flavonoides (Rahman, 2007; Milner 2005; Banerjee, 2003).

Los derivados tetrahidro- β -carbolina se forman por condensación entre triptófano y aldehído, similar a la producción de ácido pirúvico por la vía allin-allicin o el proceso de reacción de Maillard (Banerjee et al., 2003).

1.2.3. Propiedades saludables del ajo negro

Hasta el año 2006, pocas investigaciones se habían realizado debido a la menor popularidad de los productos, incluso entre el campo de la investigación. En 2007, el ajo negro hizo un debut sensacional con una fuerte potencia antitumoral demostrado por el modelo de tumor de ratón (Sasaki et al., 2007).

Los trabajos bio-funcionales del ajo negro gradualmente han ido apareciendo junto con la ganancia de su popularidad. En los últimos años numerosos estudios han reportado que los extractos de ajo negro tienen efectos antioxidantes, antialérgicos, antidiabéticos, antiinflamatorios, hipocolesterolémicos, hipolipidémicos y anti-carcinógenos (Banerjee et al., 2003; Bayan et al., 2013; Tanamai et al., 2004; Lee et al., 2009; Jeong et al., 2016; Wang et al., 2010; Lee et al., 2011; Kang et al., 2016; Sasaki et al., 2007)

En el proceso de transformación de ajo fresco en ajo negro suceden numerosas reacciones bioquímicas que incrementan notablemente las propiedades antioxidantes del ajo fresco (Riu and Kang, 2017, Bae et al., 2014). El ajo negro contiene un gran número de componentes funcionales, como los polifenoles, los compuestos de azufre, los alcaloides de la p-carbolina y algunos oligoelementos como selenio, germanio entre otros. A través del especial procesamiento térmico del ajo negro, es más fácil de absorber, y su efecto beneficioso también se ha mejorado.

A lo largo del proceso de fabricación del ajo negro aumentan de manera notable el compuesto S-

Allylcysteine y los compuestos derivados de las reacciones de oscurecimiento (Bae et al., 2014). El compuesto S-Allylcysteine se forma por el catabolismo de γ -glutamylcysteine e inhibe el daño oxidativo relacionado con el envejecimiento y diversas enfermedades (Bayan, 2014).

En un estudio realizado por Bae (2014) se estudia la evolución del compuesto SAC durante la fabricación de ajo negro a varias temperaturas, concluyendo que se producen mayores aumentos cuando la temperatura es menor.

El ajo negro es un producto de reciente desarrollo que se ha expandido muy rápidamente por numerosos países. No existen actualmente protocolos de normalización para la fabricación del ajo negro por lo que parece interesante el estudio de los factores que afectan la calidad del producto para definir las especificaciones del mismo. En este sentido, la capacidad antioxidante y compuestos como SAC que aumentan notablemente en el ajo negro al compararlo con el fresco parecen ser los más indicados para estandarizar la calidad de las diferentes producciones. (Bae et al., 2014)



HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

El objetivo principal de esta Tesis Doctoral fue la búsqueda de los factores que pudieran afectar a la optimización del proceso de fabricación del ajo negro, con el fin de conocer el período óptimo de tratamiento para maximizar las propiedades saludables.

La hipótesis de partida planteada fue que la composición fisicoquímica y fisiológica del ajo negro pudiera depender de varios de factores:

- Condiciones del proceso: temperatura, humedad y tiempo.
- Utilización de material vegetal de dos tipos atendiendo a la presentación del producto: ajos en cabezas enteras, o dientes pelados.
- Utilización de ajo de diferentes variedades y diferentes tiempos de almacenamiento del ajo.

Para demostrar dicha hipótesis se realizaron diferentes ensayos de fabricación de ajo negro modificando variables de tiempo, temperatura, tipo de material vegetal (cabezas enteras- ajos pelados; variedad *Morado*, *Blanco Americano* y *Temprano*; ajo cosechado en 2013- ajo cosechado en 2014) y realizando análisis de los diferentes parámetros de calidad en el ajo fresco y en varios controles durante la fabricación.

En este estudio se establecieron además los siguientes **objetivos específicos**:

- Evaluar y comparar determinadas propiedades fisicoquímicas y fisiológicas de ajo fresco y del ajo negro en diferentes controles realizados en fabricaciones a tres temperaturas diferentes comparando además dos tipos de producto diferentes: bulbos enteros y ajos pelados.
- Evaluar la influencia de la variedad y el tiempo de almacenamiento del ajo fresco en la evolución de la composición fisicoquímica y antioxidante en la fabricación de ajo negro bajo unas determinadas condiciones de temperatura y tiempo.
- Evaluar de manera cualitativa y cuantitativa diferentes propiedades saludables del ajo fresco y de diferentes tipos de ajo negro: efectos genotóxicos, antígenotóxico, esperanza de vida y citotoxicidad

BIBLIOGRAFÍA CITADA EN LA INTRODUCCIÓN

1. Ackermann RT, Mulrow CD, Ramirez G, Gardner CD, Morbidoni L, Lawrence VA. Garlic shows promise for improving some cardiovascular risk factors. *Arch Intern Med.* 2001, Mar 26;161(6):813-24.
2. Amagase H, Milner JA. Impact of various sources of garlic and their constituents on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene binding to mammary cell DNA. *Carcinogenesis* 1993,14: 1627-1631.
3. Amagase, H. Significance of Garlic and Its Constituents in Cancer and Cardiovascular Disease, Clarifying the Real Bioactive Constituents of Garlic. *J. Nutr.* 2006. 0022-3166/06.
4. Amagase H., Petesch B.L.; Matsuura H. Kasuga S., Itakura Y. Intake of garlic and its bioactive components. *J. Nutr.* 2001, 131, 955S–962S.
5. Ashraf R, Aamir K, Shaikh AR, Ahmed T. Effects of garlic on dyslipidemia in patient with type 2 diabetes mellitus. *J Ayub Med Coll Abbottabad.* 2005;17:60-4.
6. Banerjee, S.; Mukherjee, P.K.; Maulik, S. Garlic as an antioxidant: The good, the bad and the ugly. *Phytother. Res.* 2003, 17, 97–1
7. Bayan L., Koulivand P.H., Gorji A. Garlic: a review of potential effects. *Avicenna Journal of Phytomedicine* Vol. 4, No. 1, Jan-Feb 2014, 114
8. Benklebia N. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Lebensm-Wiss. U-Technol* 2004; 37: 263-268
9. Block E. The organosulfur chemistry of the genus *Allium* implications for organic sulfur chemistry. *Angew Chem., Int.Ed.Engl.* 1992;31:1135-78.
10. Block, E. Química del ajo y la cebolla. *Investigación y Ciencia* 1985, 103: 86-91.
11. Borek, C. Antioxidant health effects of aged garlic extract. *J. Nutr.* 2001, 131, 1010S–

- 1015S.
12. Borek C. Garlic reduces dementia and heart-disease risk. *J Nutr.* 2006 Mar;136(3 Suppl):810S-812S.
 13. Borkowska A, Knap N, Antosiewicz J. 2013. Diallyl Trisulfide Is More Cytotoxic to Prostate Cancer Cells PC-3 than to Noncancerous Epithelial Cell Line PNT1A: A Possible Role of p66Shc signaling Axis. *Nutr Cancer*, 65: 711-717.
 14. Bozin, B., Mimica-Dukić, N., Samojlik, I., Goran, A & Igić, R.. Phenolics as antioxidants in garlic (*Allium sativum* L., Alliaceae). *Food Chemistry* 2008, 111: 925-929.
 15. Calderón P. R. Evaluación del proceso de obtención de ajo negro a partir de distintas variedades de ajo. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, 2015.
 16. Camargo and Manucha 2017. Potencial rol protector del óxido nítrico y Hsp70 asociado a alimentos funcionales en la arterioesclerosis. *Clinica e Investigación en Arterioesclerosis* 2017,;29 (1) 36-45.
 17. Cao, G., Sofic, E. & Prior, R.L. Antioxidant capacity of tea and common vegetables. *Journal Agriculture Food Chemistry* 1996, 44: 3426-3431.
 18. Cavagnaro, P.F. Camargo, A. Galmarini, C.R. & Simon, P.W.. Effect of cooking on garlic (*Allium sativum* L.) Antiplatelet Activity and thiosulfinates content. *Journal Agriculture Food Chemistry* 2007, 55:1280-1288.
 19. Cavallito, C.J. & Bailey, J.H.A.. Allicin the antibacterial principle of *Allium sativum*. I Isolation physical properties and antibacterial action. *Journal American Chemical Society* 1944, 66: 1950-1951.
 20. Chan JY, Yuen AC, Chan RY, Chan SW.. A review of the cardiovascular benefits and antioxidant properties of allicin. *Phytother Res* 2013. 27: 637-646.

21. Choi D.J., Lee S.J., Kang M.J., Cho H.S., Sung N.J., Shin J.H. Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2008, 37, 465–471.
22. Choi I.S., Cha H.S., Lee Y.S. Physicochemical and antioxidant properties of black garlic. *Molecules* 2014, 19, 16811–16823.
23. Cicero AFG, Colletti A. Role of phytochemicals in the management of metabolic syndrome. *Phytomedicine*. 2015
<http://dx.doi.org/10.1016/j.phymed.2015.11.009>, pii:S09447113(15)00361-X,
24. Coppi A., Cabinian M., Mirelman D. and Sinnis P., 2006 Antimalarial Activity of Allicin, a Biologically Active Compound from Garlic Cloves *Antimicrob Agents Chemother.* 2006 May; 50(5): 1731–1737. doi:[10.1128/AAC.50.5.1731-1737.2006](https://doi.org/10.1128/AAC.50.5.1731-1737.2006).
25. Crozier A., Burns J., Aziz A. A., Stewart A.J., Rabiasz H.S., Jenkins, G.I., Edwards C.A. & Lean, M.E.J.. Antioxidant flavonols from fruits, vegetables and beverages: measurements and bioavailability. *Biological Research* 2000, 33(2): 79-88.
26. Dahanukar SA, Thatte UM. Current status of ayurveda in phytomedicine. *Phytomedicine*. 1997;4:359–368.
27. De Luis, D. A. & Aller, R.. Ajo y riesgo cardiovascular. *Anales de Medicina Interna* 2008, 25(5): 237-240.
28. Dušica P. Ilić , Vesna D. Nikolić, Ljubiša B. Nikolić, Mihajlo Z. Stanković, Ljiljana P. Stanojević, Milorad D. Cakić. Allicin and related compounds: Biosynthesis, synthesis and pharmacological activity. *Facta Universitatis, Series: Physics, Chemistry and Technology* Vol. 9, No 1, 2011, pp. 9 - 20 DOI: 10.2298/FUPCT1101009I
29. Espinoza Cáceres, F. W., Ríos Ríos, E. M^a. & Elías Peñafiel, C. C. A. 2010. Determinación

- de fenoles totales, fructanos y pungencia en seis cultivares de ajos (*Allium sativum* L.) en el Perú. *Revista Sociedad Química del Perú*, 76 (1): 101-109.
30. Finley JW. Reduction of cancer risk by consumption of selenium-enriched plants: enrichment of broccoli with selenium increases the anticarcinogenic properties of broccoli. *J Med Food* 2003.6: 19-26.
31. Florencio Greco, M . Estudio de procesos de deshidratación industrial del ajo con la finalidad de preservar la alicina como principio activo, Universidad Nacional de Cuyo, Mendoza, Argentina 2011.
32. García Alonso, C. R.. El ajo. 2ª ed. Ed. MundiPrensa 1998 Madrid.
33. García Gómez, L. J. & Sánchez Muniz, F. J. Revisión: Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición* 2000, 50(3): 219-229.
34. Gardner CD, Chattejee LM, Carlson JJ. The effect of a garlic preparation on plasma lipid levels in moderately hypercholesterolemic adults. *Atherosclerosis*, 2001;154:213–220.
35. González R.E; Soto V.C, Sauce M.M; Camargo,A.B & Galmarini, C.R. Variability of solids, organosulfur compounds; pungency and HealthEnhancing traits in garlic (*Allium sativum* L.) cultivars belonging to different Ecophysiological groups. *Journal Agriculture Food Chemistry* 2009., 57: 10282-10288.
36. Gorinstein, S., Leontowicz, M., Leontowicz, H., Najman, K., Namiesnik, J., Park, Y.-S.,Trakhtenberg, S.Supplementation of garlic lowers lipids and increases antioxidant capacity inplasma of rats. *Nutrition Research*, (2006) 26(7), 362-368. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2006.06.008>
37. Green, O. C., III & Polydoris, N. G. The chemistry of garlic and onions. *Garlic, Cancer and Heart Disease: Review and Recommendations* :21-41 GN Communications Chicago(1993), IL.

38. Imai J., Ide N. Nagae S., Moriguchi T., Matsuura H., Itakura Y. Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med.* 1994, 60, 417–420.
39. Hasler C.M. Functional foods: benefits, concerns and challenges-a position paper from the american council on science and health. *J Nutr.* 2002 Dec;132(12):3772-81
40. Higdon, Jane V. et al., Cruciferous Vegetables and Human Cancer Risk: Epidemiologic Evidence and mechanistic basis. *Pharmacological Research* 2007.55: 224-36
41. J Hedges & C E Lister the nutritional attributes of Allium species *LCrop & Food Research Confidential Repor* January 2007t No. 1814
42. Jeong, Y.Y. , Ryu, J.H., Shin, J.-H., Kang, M.J., Kang, J.R., Han, J., Kang, D. Comparison of anti-oxidant and anti-inflammatory effects between fresh and aged black garlic extracts. *Molecules* 2016, 21, 430
43. Ji Hyeon Ryu and Dawon Kan 2017. Physicochemical Properties, Biological Activity, Health Benefits, and General Limitations of Aged Black Garlic: A Review *Molecules* 2017, 22, 919; doi:10.3390/molecules22060919 www.mdpi.com/journal/molecules
44. Jonkers D, Sluimer J, Stobberingh E. Effect of garlic on vancomycin-resistant enterococci. *Antimicrob Agents Chemother* 1999, 43: 3045
45. Kahn, G. History of garlic. Koch, H. P. Lawson, L. D. eds. *Garlic: The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and Related Species* 1996 :25-36
46. Kang, O.-J. Physicochemical characteristics of black garlic after different thermal processing steps. *Prev. Nutr. Food Sci.* 2016, 21, 348,
47. Kempaiah, R. K. & Srinivasan, K. Influence of dietary curcumin, capsaicin and garlic on the antioxidant status of red blood cells and the liver in high-fat-fed rats. *Annals of Nutrition and*

- Metabolism 2004, 48, 314-320.
48. Kim, D.G.; Kang, M.J.; Hong, S.S.; Choi, Y.H.; Shin, J.H. Antiinflammatory effects of functionally active compounds isolated from aged black garlic. *Phytother. Res.* 2017, 31, 53–61
49. Kimura, S.; Tung, Y.-C.; Pan, M.-H.; Su, N.-W.; Lai, Y.-J.; Cheng, K.-C. Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application. *J. Food Drug Anal.* 2016, 11, 3.
50. Knowles LM, Milner JA. 2003. Diallyl disulfide induces ERK phosphorylation and alters gene expression profiles in human colon tumor cells. *J Nutr*, 133: 2901-2906.
51. Kweon S, Park KA, Choi H. 2003. Chemopreventive effect of garlic powder diet in diethylnitrosamineinduced rat hepatocarcinogenesis. *Life Sci*, 73: 25152526
52. Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, 1112, 3-22.
53. Lau BH, Woolley JL, Marsh CL, Barker GR, Koobs DH, Torrey RR. 1986. Superiority of intralesional immunotherapy with *Corynebacterium parvum* and *Allium sativum* in control of murine transitional cell carcinoma. *J Urol*, 136: 701-705.
54. Lawson, L. D. Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: *Phytomedicines of Europe 1998. Chemistry and Biological Activity. ACS Symposium Series 691* (Lawson, L. D. & Bauer, R., eds.), pp. 176–209. American Chemical Society, Washington, DC.
55. Ledezma, E. & Apitz Castro, R.. Ajoene, el principal compuesto activo derivado del ajo (*Allium sativum*), un nuevo agente antifúngico. *Revista Iberoamericana de Micología* 2006, 23: 75-80. .

- 56.** Lee, E.N., Choi, Y.W. Kim, H.K., Park, J.K., Kim, H.J., Kim, M.J., Lee, H.W., Kim, K.H., Bae, S.S., Kim, B.S. Chloroform extract of aged black garlic attenuates TNF- α -induced ROS generation, VCAM-1 expression, NF- κ B activation and adhesiveness for monocytes in human umbilical vein endothelial cells. *Phytother. Res.* 2011, 25, 92–100.
- 57.** Lee, S.-J.; Shin, J.-H.; Kang, M.-J.; Jung, W.-J.; Ryu, J.-H.; Kim, R.-J.; Sung, N.-J. Antioxidant activity of aged red garlic. *J. Life Sci.* 2010, 20, 775–781.
- 58.** Lee, Y.-M., Gweon, O.-C., Seo, Y.-J.; Im, J., Kang, M.-J.; Kim, M.-J.; Kim, J.-I. Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutr. Res. Pract.* 2009, 3, 156–161.
- 59.** Lin JG, Chen GW, Su CC, Hung CF. Garlic components diallyl sulfide and diallyl disulfide on arylamine N-acetyltransferase activity and 2-aminofluorene-DNA adducts in human promyelocytic leukemia cells. *Am J Chin Med* 2002, 30: 315-325.
- 60.** Matsuura, H. Saponins in garlic as modifiers of the risk of cardiovascular disease. *The Journal of Nutrition* 2001, 131, 1000S-1005S.
- 61.** Milner, J.A. Garlic and Cancer Prevention, in: Milner, J.A., Romagnolo, D.F. (Eds.), *Bioactive Compounds and Cancer, Nutrition and Health*. Humana Press 2010, pp. 567–588.
- 62.** Moyers, S. History of garlic. *Garlic in Health, History and World Cuisine* 1996 :1-36 Suncoast Press St. Petersburg, FL. Numbers 11:5, The Bible.
- 63.** Mukherjee S., Leki, I., Goswami S & Das, D.K.. Freshly crushed garlic is a superior cardio protective agent than processed garlic. *Journal Agriculture Food Chemistry* 2009, 57(15): 7137-7144.
- 64.** Muñoz Quezada, S., Gómez Llorente, C. & Gil Hernández, A. (). Compuestos bioactivos de los alimentos de origen vegetal y obesidad. *Nutrición Clínica en Medicina* 2010, 4(3):138-152.

65. Ninfali, Paolino, et al.,. Antioxidant Capacity of Vegetales, Spices and Dressings Relevant to Nutrition. *British Journal of Nutrition* 2005 93:257-66
66. Nishino H, Iwashima A, Itakura Y, Matsuura H, Fuwa T.. Antitumorpromoting activity of garlic extracts. *Oncology* 1989, 46: 277-280
67. Omar SH.. Garlic and Cardiovascular Diseases. *Natural Products* 2013: Springer, 36613696
68. Omar, S.H., Al-Wabel, N.A., 2010. Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal* 18, 51–58.ng,
69. D., Y. Feng, J. Liu, J. Yan, M. (2010). Black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance the immune system. *Med. Aromatic Plant Sci. Biotech.*, 4: 37-40.
70. Padiya R and Banerjee SK.. Garlic as an anti-diabetic agent: recent progress and patent reviews. *Recent Pat Food Nutr Agric* 2013, 5: 105127.
71. Peleg A, Hershcovici T, Lipa R, Anbar R, Redler M, Beigel Y Effect of garlic on lipid profile and psychopathologic parameters in people with mild to moderate hypercholesterolemia. *Isr Med Assoc J.* 2003;5:637---40.73.
72. Rahman K, Lowe GM.. Significance of garlic and its constituents in cancer and cardiovascular disease. *J Nutr* 2006, 136: 736S740S.
73. Rahman, M.S. Allicin and other functional active components in garlic: Health benefits and bioavailability. *Int. J. Food Prop.* 2007, 10, 245–268.
74. Raigón, M. D.. El nivel de pungencia de las cebollas. *Horticultura Internacional* 2006, 51(2): 48-51.
75. Reinhart, K.M., Coleman, C.I., Teevan, C., Vachani, P. & White, M.. Effects of Garlic on Blood Pressure in Patients With and Without Systolic Hypertension: A Meta-Analysis. *The*

- Annals of Pharmacotherapy 2008, 42: 1766-1771.
76. Riddle, J. M. The medicines of Greco-Roman antiquity as a source of medicines for today. Holland 1996 , B. K. eds.
77. Ryu, J.H.; Kang, D. Physicochemical Properties, Biological Activity, Health Benefits, and General Limitations of Aged Black Garlic: A Review. *Molecules* 2017, 22, 919.
78. Rodríguez Galdón, B.. Caracterización química de variedades locales de cebolla. Tesis Doctoral. Universidad de La Laguna 2009. Tenerife.
79. Sanz Pérez, B. El variado mundo de los alimentos funcionales, nutracéuticos y suplementos dietéticos. Monografías del Instituto de España 2009.. Souci.
80. Sasaki, J.-I.; Lu, C.; Machiya, E.; Tanahashi, M.; Hamada, K. Processed black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance anti-tumor potency against mouse tumors. *Med. Aromat. Plant Sci. Biotechnol.* 2007, 1, 278–281.
81. Seo, Y.-J., Gweon, O.-C., Lee, Y., Kang, M., Kim, J. Effect of garlic and aged black garlic on hyperglycemia and dyslipidemia in animal model of type 2 diabetes mellitus. *J. Food Sci. Nutr.* 2009, 14, 1–7.
82. Shin, J.H., Choi D.J., Lee S.J., Kwon O.C., Cha, J.Y., Sung, N.J. Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2008, 37, 965–971.
83. Sivam GP Protection against *Helicobacter pylori* and other bacterial infections by garlic *J Nutr.* 2001 Mar;131(3s):1106S-8S.
84. Sparnins VL, Mott AW, Barany G, Wattenberg LW. 1986. Effects of allyl methyl trisulfide on glutathione S-transferase activity and BPinduced neoplasia in the mouse. *Nutr Cancer*, 8: 211-215.

- 85.** Steiner, M. & Lin, R. S. (1998) Changes in platelet function and susceptibility of lipoproteins to oxidation associated with administration of aged garlic extract. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 31:904-908.
- 86.** Steiner, M., Khan, A. H., Holbert, D. & Lin, R.I. (1996) A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids. *Am. J. Clin. Nutr.* 64:866-870.
- 87.** Tanamai, J.; Veeramanomai, S.; Indrakosas, N. The efficacy of cholesterol-lowering action and side effects of garlic enteric coated tablets in man. *J. Med. Assoc. Thail.* 2004, 87, 1156–1161.
- 88.** Torija Isasa, M^a. E. Fibra dietética y salud Concepto y composición de la obra dietética. Los alimentos como fuente de fibra. Cátedra Kellogg's. Alimentando el conocimiento 2011.
- 89.** Torija M .E., Matallana M. C., y Nahir Chalup. El ajo y la cebolla: de las medicinas antiguas al interés actual *Bol. R. Soc. Esp. Hist. Nat. Sec. Biol.*, 107, 2013, 29-37 ISSN: 0366-3272
- 90.** Tsai, C.-W., Chen, H.-W., Sheen, L.-Y., Lii, C.-K. Garlic: Health benefits and actions. *BioMedicine* 2012, 2, 17–29.
- 91.** Ulloa, J. A., Espinosa Andrews, H.& Cruz Rodríguez, G.K.. Los fructanos y su papel en la promoción de la salud. *Revista Fuente* 2010. Año 2. 5: 57-62.
- 92.** Vinson J.A., Hao Y., Su X., Zubik L., Phenol antioxidant quantity and quality in foods: vegetables. *J. Agric. Food Chem.*, 1998, 46, 3630–3634.
- 93.** Wang, D., Feng Y., Liu J., Yan J., Wang M., Sasaki J., Lu C. Black Garlic (*Allium sativum*) Extracts Enhance the Immune System. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology* 2010, 4 (1), 37-40. Global Science Books.

94. Wargovich MJ, Woods C, Eng VW, Stephens LC, Gray K. Chemoprevention of N-nitrosomethylbenzylamine-induced esophageal cancer in rats by the naturally occurring thioether, diallyl sulfide. *Cancer Res* 1988., 48: 6872-6875.
95. Wattenberg LW, Sporn VL, Barany G. Inhibition of N-nitrosodiethylamine carcinogenesis in mice by naturally occurring organosulfur compounds and monoterpenes. *Cancer Res* 1989., 49: 2689-2692.
96. Wills E.. Enzyme inhibition by allicin, the active principle of garlic. *Biochem J* 1956, 63: 514-520.
97. Woodward, P. W. Changes in platelet function and susceptibility of lipoproteins to oxidation associated with administration of aged garlic extract. *Garlic and Friends: The History, Growth and Use of Edible Alliums* 1996:2-22 Hyland House Melbourne, Australia.
98. Zhang L, Gail MH, Wang YQ, Brown LM, Pan KF, Ma JL, Amagase H, You WC, Moslehi R. A randomized factorial study of the effects of long-term garlic and micronutrient supplementation and of 2-wk antibiotic treatment for *Helicobacter pylori* infection on serum cholesterol and lipoproteins. *Am J Clin Nutr*. 2006 Oct;84(4):912-9
99. Zhang, X., Li, N., Lu, X., Liu, P., and Qiao, X. Effects of temperature on the quality of black garlic. *J Sci Food Agric*. 2016; 96: 2366–2372.

ARTÍCULO 1

“ Evolution of some physicochemical and antioxidants properties of black garlic whole bulbs and peeled cloves” Food Chemistry 199 (2016) 135-139.

M Ángeles Toledano Medina¹, Jesús Pérez-Aparicio ¹; Rafael Moreno-Rojas ²Tania Merinas-Amo³

1 Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Avda. Félix Rodríguez de la Fuente sn, Palma del Río, Córdoba, 14700, Spain.

2 Department of Genetics. Campus Rabanales, Gregor Mendel Building. University of Córdoba. Spain.

3 Department of Food Science and Technology. Campus Rabanales, Darwin Building. University of Córdoba. Spain

Abstract

Black garlic was produced at three different temperatures of heat treatment (72°, 75° and 78 °C) and close to 90% of relative humidity. Two types of material source were used: whole bulbs and peeled cloves. Total soluble solid content (°Brix), pH, water activity (aw), browning intensive (L value), total polyphenol content, antioxidant capacity and total polyphenol index of the raw and heated garlic were determined. This study showed the changes occurring in the physicochemical and antioxidant properties of the garlic during the heat-treatment evolution. The soluble solid content (°Brix) in garlic increased gradually and the pH decreased in whole bulb and peeled garlic. The polyphenol content measured by the Folin-Ciocalteu method showed a significant increase during the heat-treatment in all the cases. Also, the antioxidant capacity measured by the ABTS radical increased significantly during the heat-treatment.

Keywords: whole black garlic bulbs; peeled black garlic cloves; heat-treatment; polyphenols; antioxidant capacity; browning intensity; pH; soluble solid content.



Main Text

1. Introduction

Garlic has been considered in many cultures to be a food with exceptional therapeutic qualities. The properties beneficial to health of garlic have been described in many research works describing its preventive and even curative effects in many diseases (Milner, 2010, Omar and Al-Warble, 2010; Chia-Wen et al., 2012 and Leyla et al 2014). However, raw garlic consumption is not very widespread mainly due to its characteristic pungent taste. Therefore, many new industrial processes are being investigated in order to obtain garlic products with improved organoleptic properties retaining and even enhancing its beneficial properties. This is the case of black garlic, a product traditionally manufactured in southeast Asia and recently extended to other garlic producing areas like California (U.S.A.), Argentina, Canada and Europe.

Black garlic is manufactured by keeping raw garlic in a temperature and humidity controlled room for several days. The changes in the processing length depend mainly on the temperature. If the processing temperature is high then the processing duration is shorter. Previous reports have described processing temperatures of between 40-90 °C and heating times of between 5-45 days (Sasaki, 2007; Wang et al 2010 and Sang et al. 2013). At the end of the heat-treatment, black garlic is partly dehydrated. Finally whole bulbs or peeled cloves of black garlic are packaged in plastic or glass containers without adding any preservatives.

The physicochemical characteristics of black garlic and raw garlic are very different (Choi et al., 2008). During heating, raw garlic undergoes intensive Maillard browning. In early days of heating, caramel and brown tones appear and a few days later the garlic changes its color to black. Black garlic has a rubbery texture and its taste is bittersweet without the characteristic pungent flavor of raw garlic.

There are many reports of bioassays on the beneficial effects on health of black garlic (Sato et al.,



2006, Lee et al., 2009, Seo et al 2009, Wang et al 2010). However, few reports describe black garlic processing. The aim of this study was to evaluate, through different analytical techniques, some physicochemical and antioxidants properties of black garlic produced at three different temperatures, comparing two different products as raw material source, whole bulbs and peeled cloves.

2. Material and methods

2.1 Samples

Black garlic was manufactured at three different heating temperatures (72°, 75° and 78 °C) with relative humidity of nearly 90%. Raw garlic samples and samples taken (whole bulbs and peeled cloves) during the aging of garlic were analyzed. Sampling was made at different times depending on the heating temperature. Thus, when the heat treatment was at 78 °C, samples were taken after 5, 10 and 14 days of heat treatment; at 75 °C, samples were taken after 7, 14 and 21 days of heat treatment, and at 72 °C, samples were taken after 11, 24 and 33 days of heat treatment.

All samples were crushed and divided into three sub-samples. A previous peeling before crushing was needed in whole garlic bulbs.

2.2. Measurement of soluble solid content, pH, a_w , and Browning intensity

Total soluble solid content (°Brix), pH, water activity (a_w), and browning intensity (L value) were determined in all samples during heat treatment. Determinations in duplicate were carried out. Garlic soluble solids (°Brix) were measured by an *Abbe Refractometer*. Garlic pH was measured with a pH meter *Crison Basic 20*. Garlic water activity (a_w) was measured with an *Aqualab Series 3/3TE* meter with a temperature stabilizer. Garlic browning intensity was determined by a *Konica Minolta CR-410 Croma Meter colorimeter*. L value was taken because this reading corresponds to product luminescence (L -100 =white; L -0= black).



2.3 Total polyphenol content, antioxidant capacity and total polyphenol index

A *Perkin Elmer Lambda 20 UV VIS spectrophotometer* was used to analyze raw and heated garlic, total polyphenol content, antioxidant capacity and total polyphenol index. A previous garlic extraction was prepared to analyze antioxidant properties. Before this, all samples were lyophilized and five extracts per sample were obtained. Garlic extract was prepared dissolving 0.3 g of the lyophilized sample in 10 ml of a mixture at 50% v/v of ethanol and distilled water. Next, samples were stirred during one hour and then filtered using a Buchner funnel with *Whatman paper* into a vacuum flask connected to a vacuum pump filter. The filtered extract was leveled at 25 ml with a hydroalcoholic solution of 50% v/v.

The polyphenol concentration of garlic samples was determined by *Folin-Ciocalteu method* (Singleton, 1999). To a volumetric 25ml flask, 0.5 ml of extract, 10 ml of distilled water, 1 ml of *Folin-Ciocalteu* reagent and 3 ml of carbonate sodium 20% w/v were added, and diluted to volume (25ml) with distilled water. The mixture was heated at 50°C during 5 minutes to accelerate the coloration reaction. Subsequently, it was cooled with water and the reading was performed in the *spectroPHOTO"meter* at 765 nm. The reading was compared to a calibration curve prepared with different gallic acid solutions: 75, 100, 200, 250, 300 ppm. Polyphenol content results were expressed considering the dilution of the sample (0.3 g in 25 ml) in grams of gallic acid equivalent per kilogram of lyophilized sample.

Raw and heated garlic antioxidant capacity was determined by *ABTS radical method* (Re et al. 1999). A mix of 2.557 ml of a solution of 7 mM *ABTS reagent* and 0.333 ml of a solution of 2.25 mM potassium persulfate in distilled water was made. The prepared solution was stored in darkness during 16 hours, enough time for the radical formation ($ABTS^+$). Then, 0.15 ml of the $ABTS^+$ solution was diluted in 15 ml of ethanol. The absorbance value at 734 nm was adjusted near 0.7 (A_0). Next, 0.980 ml of $ABTS^+$ solution and 0.02 ml of garlic extract sample were added. After



stirring it, the absorbance was read at 734 nm after 7 minutes (A_1). The inhibition percentage was calculated by the following expression:

$$\% \text{ inhibition} = (A_0 - A_1) * 100 / A_0$$

A calibration curve was built with the following Trolox concentrations: 0.1; 0.5; 1 and 1.5 mM. Considering the sample dilution, results were expressed in mmol Trolox- equivalent per kilogram of lyophilized sample.

Total polyphenol index was calculated multiplying the garlic extract absorbance reading at 280 nm per the sample dilution.

Statistical analysis

All results obtained in this study were analyzed by an analysis of variance. Average values at different processing times were compared according to the Tukey test.

3. Results and discussion

3.1 °Brix, pH, a_w y Browning intensity

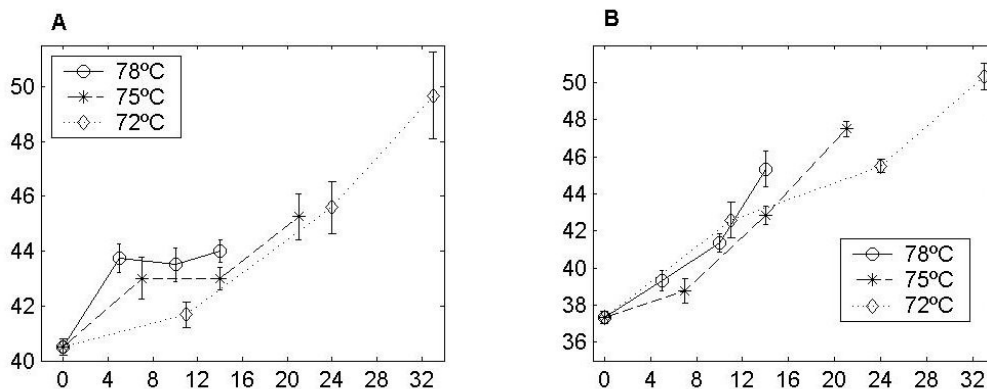
Soluble solids content, pH, water activity and browning intensity are shown in Table 1. It is noted that the evolution of the physicochemical characteristics in whole garlic bulbs was very similar to that of peeled garlic cloves. During heat-treatment, in the garlic, its soluble solid content (°Brix) and browning intensity increased, and its pH and a_w decreased. However, it was observed that in whole garlic bulbs and peeled cloves the soluble solid content, pH and browning intensity changed faster if the temperature was higher. Similar °Brix readings were obtained in whole garlic bulbs and peeled garlic cloves even from different initial °Brix readings. The increase in garlic soluble solid content could be the reason for the characteristic black garlic sweetness (Sasaki et al., 2007) (see figure 1)

At the end of the heat-treatment, homogeneous Tukey tests showed °Brix readings always higher



than raw garlic ones. Significant differences in °Brix readings at three temperatures and in the two types of products manufactured/made (Table 1) were observed. At the end of the heat-treatment, whole garlic bulbs °Brix readings with heat-treatment at 78 °C and 75 °C (44.00 and 45.25, respectively) were lower than those of peeled garlic cloves °Brix readings (45.33 and 47.5, respectively).

In Figure 2 it is shown how the pH decreased during the manufacturing process. Raw garlic pH was nearly 6 (5.93 and 6.31 in whole garlic bulbs and peeled garlic cloves, respectively) whereas black garlic pH at the end of heat-treatment reached values below 3.8 in all the cases. Changes in pH whole bulbs and peeled cloves samples were very similar. It was demonstrated how if the heat-treatment of the garlic was at a higher/high temperature then the pH decreased more rapidly (Figure 2).



F

Figure 1. Evolution of soluble solids (mean ± SEM) in whole garlic bulbs (A) and peeled cloves (B) during heat-treatment at various temperatures.



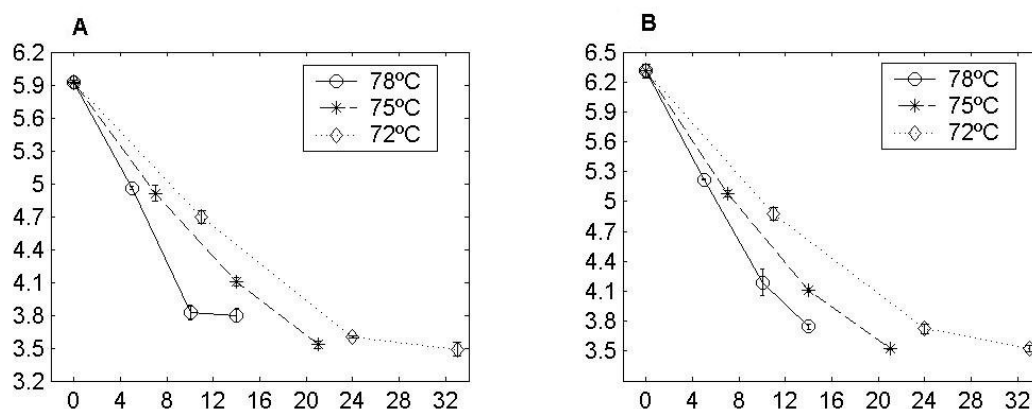


Figure 2. Evolution of Ph (mean± SEM) in whole garlic bulbs (A) and peeled garlic cloves (B) during heat-treatment at various temperatures

At higher temperatures (78 °C) lower pH values were reached. The same observation has recently been described (Sang et al., 2013). A heating temperature of over 60°C and a decrease in pH below 4.2 are two important factors for preventing the possibility of anaerobic bacteria proliferation.

Water activity (a_w) decreased less than other parameters because black garlic was manufactured maintaining high relative humidity. However, raw and black garlic a_w at the end of heat-treatment showed significant differences (Table 1).



Table 1. Soluble solid content ($^{\circ}$ Brix), pH, water activity (a_w) and browning intensity (L value) of raw garlic ($t=0$) and black garlic from whole bulbs and peeled garlic cloves at different times ($t=0,5,10\dots$) during heat-treatment and various processing temperatures (78, 75 and 72 $^{\circ}$ C).

T	BRIX		pH		a_w		L value	
	Whole Bulbs	Peeled garlic	Whole bulbs	Peeled garlic	Whole bulbs	Peeled garlic	Whole bulbs	Peeled Garlic
0	40.50 \pm 0.29a	37.33 \pm 0.33a	5.93 \pm 0.01a	6.31 \pm 0.07a	0.97 \pm 0a	0.98 \pm 0a	52.05 \pm 0.38a	36.05 \pm 0.48 ^a
T ^a 78 $^{\circ}$ C								
5	43.75 \pm 0.51b	39.33 \pm 0.56ab	4.96 \pm 0.01b	5.22 \pm 0.01b	0.96 \pm 0b	0.98 \pm 0a	26.28 \pm 0.21b	30.21 \pm 0.38b
10	43.50 \pm 0.6b	41.33 \pm 0.49b	3.82 \pm 0.07c	4.19 \pm 0.13c	0.94 \pm 0c	0.94 \pm 0b	20.44 \pm 0.15c	20.70 \pm 0.42c
14	44.00 \pm 0.41b	45.33 \pm 0.94 c	3.80 \pm 0.06c	3.74 \pm 0.02d	0.93 \pm 0d	0.94 \pm 0b	19.06 \pm 0.26d	17.69 \pm 0.17d
T	**	***	***	***	***	***	***	***
T ^a 75 $^{\circ}$ C								
7	43.00 \pm 0.76ab	38.75 \pm 0.65a	4.91 \pm 0.07b	5.08 \pm 0.03b	0.96 \pm 0a	0.97 \pm 0a	26.34 \pm 0.87b	27.72 \pm 0.15b
14	43.00 \pm 0.41ab	42.83 \pm 0.48b	4.10 \pm 0.04c	4.11 \pm 0.02c	0.93 \pm 0b	0.94 \pm 0b	20.10 \pm 0.24c	19.8 \pm 0.13c
21	45.25 \pm 0.83b	47.50 \pm 0.42c	3.53 \pm 0.04d	3.52 \pm 0.01d	0.94 \pm 0b	0.93 \pm 0b	18.04 \pm 0.25c	18.00 \pm 0.42d
T	**	***	***	***	***	***	***	***
T ^a 72 $^{\circ}$ C								
11	41.67 \pm 0.48a	42.58 \pm 0.97b	4.70 \pm 0.06b	4.87 \pm 0.06b	0.96 \pm 0a	0.97 \pm 0a	22.44 \pm 0.25b	25.84 \pm 0.25b
24	45.58 \pm 0.93ab	45.50 \pm 0.34c	3.60 \pm 0.01c	3.72 \pm 0.05c	0.93 \pm 0b	0.94 \pm 0b	17.55 \pm 0.46c	18.24 \pm 0.20c
33	49.67 \pm 1.59b	50.33 \pm 0.73d	3.49 \pm 0.06c	3.52 \pm 0.03d	0.91 \pm 0b	0.92 \pm 0c	18.01 \pm 0.32c	17.85 \pm 0.27c
T	***	***	***	***	***	***	***	**

Values are means \pm standard error (SE) ($n=3$). Different letters (a,b,c) show significantly different (*: < 0.05 ; p**: $p < 0.01$; ***: $p < 0.001$)

At 78 $^{\circ}$ C, whole garlic bulbs a_w showed significant differences in all the samples. However, at this temperature, peeled garlic cloves a_w showed significant differences between samples taken after 5



and after 10 days of heat-treatment. At 75°C, significant differences were observed in whole garlic bulbs and peeled garlic cloves between the 7th and 14th days of heat-treatment.

At 72°C, black garlic manufactured with whole garlic bulbs showed significant differences in samples taken after 24 days of aging. Nevertheless, peeled garlic samples processed at 72°C showed significant differences in the three last samplings. Finally, black garlic a_w after the heat-treatment under high humidity conditions does not guarantee the absence of contamination by fungi and aerobic bacteria. Therefore, in addition to a final drying ($a_w < 0.85$), the black garlic should be packed in a protective atmosphere or applying a pasteurization treatment to it.

As Table 1 shows, browning intensity in whole bulbs and peeled garlic cloves was different in raw garlic samples, 36.05 and 52.05, respectively, due mainly to the effects of mechanical peeling and a longer exposure to air and light in the case of peeled garlic. This difference is compensated for in a few days by the heat treatment (Table 1). Despite this, at the end of the heat-treatment, a similar browning intensity was reached.

It was observed that at higher temperatures garlic browning intensity happened earlier. Garlic color finally changed to dark brown and black, mainly due to the formation of numerous compounds resulting from the reaction of non-enzymatic browning or Maillard.

3.2 Total polyphenols content, antioxidant capacity and total polyphenols index.

When comparing the evolution between raw garlic and finished black garlic, it a notable increase is observed in the total polyphenol content, antioxidant capacity and total polyphenol index. The antioxidant power of polyphenols has been demonstrated (Kang et al., 1996) so it seems logical to state that an increase in polyphenol content in black garlic is due to antioxidant properties in this product.

During heat-treatment, unstable compounds in raw garlic are transformed into stable soluble compounds with a high antioxidant power (Corzo-Martinez et al 2007, Imai et al 1994). In previous



studies on black garlic, it has been reported that this increase in its antioxidant capacity could be due to the increase in polyphenols and S-allyl-cysteine, a compound derived from alliin (Lee et al., 2009).

Table 2 shows the concentration of polyphenols, the Trolox equivalent antioxidant capacity and the total polyphenol index in whole bulbs and peeled garlic cloves at the three different processing temperatures. The two types of processed garlic had different amounts of polyphenols and antioxidant capacity. At the end of the heat-treatment, polyphenol content and antioxidant capacity experienced a greater rise in the case of peeled garlic cloves at all temperatures.

Total polyphenol content in garlic increased during the aging in all the treatments (Figure 3). The higher concentration of polyphenol content was obtained in black garlic from peeled cloves. The amount of polyphenols increased 3 fold in whole black garlic bulbs and about 6 fold in peeled black garlic cloves (Table 2). Previous black garlic studies carried out with whole bulbs have described an increase in polyphenol content of about 2.5 fold, compared to raw garlic (Jang et al., 2008). Significant differences in each sampling, especially between the two initial and the final two samplings, were observed. The higher concentration of polyphenol values was shown in black garlic manufactured/made with peeled garlic.

Antioxidant capacity in whole garlic bulbs and peeled garlic cloves was very similar (Figure 4). If the antioxidant capacity obtained after 14 days of aging, both in whole bulbs and peeled garlic cloves is compared, the highest value was reached at 78 °C. At the end of the heating process, a higher increase in antioxidant capacity of garlic was observed, i.e. 9.5 fold and 6.5 fold in whole bulbs and peeled garlic, respectively (Table 2). Lee et al described a 4.5 fold increase in black garlic antioxidant capacity (2008).

Table 2. Total polyphenol content (gr. of Gallic/kg of lyophilized sample), antioxidant capacity (TROLOX mmol/kg sample) and total polyphenol index of raw and black garlic from whole bulbs



and peeled garlic cloves during heat-treatment at different temperatures. (*:< 0.05; p**:< 0.01; ***: p< 0.001).

t	Polyphenols		Cap. Antioxidant		IPT	
	Whole	Peeled	Whole	Peeled	Whole	Peeled
	bulbs	Garlic	Bulbs	garlic	bulbs	garlic
0	5.13±0.04a	3.20±0.07a	16.03±0.41 ^a	11.75±0.27a	395.70±9.60a	290.6±7.34a
78 °C						
5	3.98±0.16a	3.11±0.08a	30.85±1.29 ^a	25.77±1.38a	302.00±6.57a	257.8±2.83a
10	11.40±0.88b	11.31±0.68b	92.17±6.86b	95.54±5.35b	958.4±54.20b	875.2±47.82b
14	14.78±0.76b	17.56±0.31c	100.47±3.35b	97.18±1.87b	1371.8±83.46c	1576.9±71.02c
t	***	***	***	***	***	***
75 °C						
7	3.86±0.45a	4.14±0.11a	30.37±1.39b	31.96±1.26b	285.3±12.32a	292.4±2.28a
14	11.68±0.31b	10.43±0.19b	91.00±1.65c	81.87±1.74c	776±19.30b	760.7±21.47b
21	16.32±0.14c	18.77±0.30c	97.74±2.18d	111.27±2.41c	1558±37.78c	1558±37.47c
t	***	***	***	***	***	***
72 °C						
11	5.30±0.16	4.41±0.23a	33.83±1.84b	34.41±1.12b	334.5±6.01a	273±4.34a
24	16.08±0.46b	16.39±0.39b	115.05±1.69c	109.35±2.18c	1558±30.80b	1430.1±68.48b
33	14.85±0.42b	17.78±0.29c	109.65±1.57c	107.86±1.34c	1884.4±28.35c	1822.9±20.17c
t	***	***	***	***	***	**

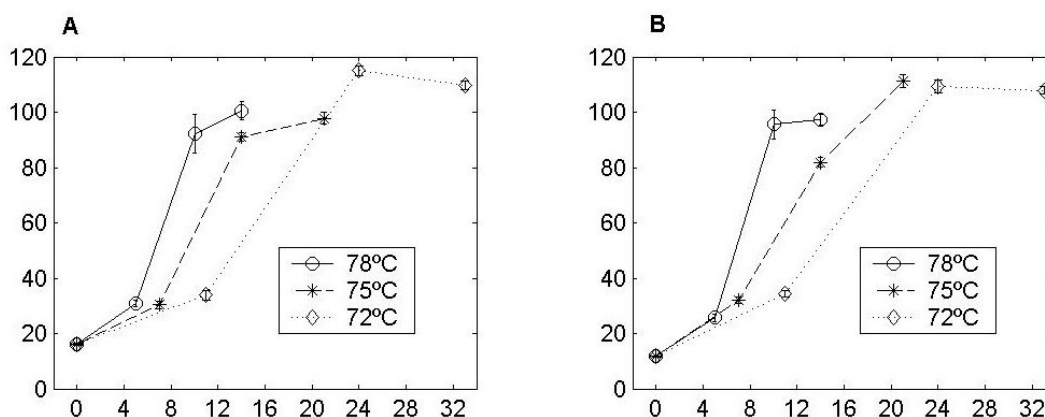


Figure 3. Evolution of antioxidant capacity (mean± SEM) in black garlic from whole bulbs (A) and peeled garlic cloves (B) during heat-treatment at different temperatures.

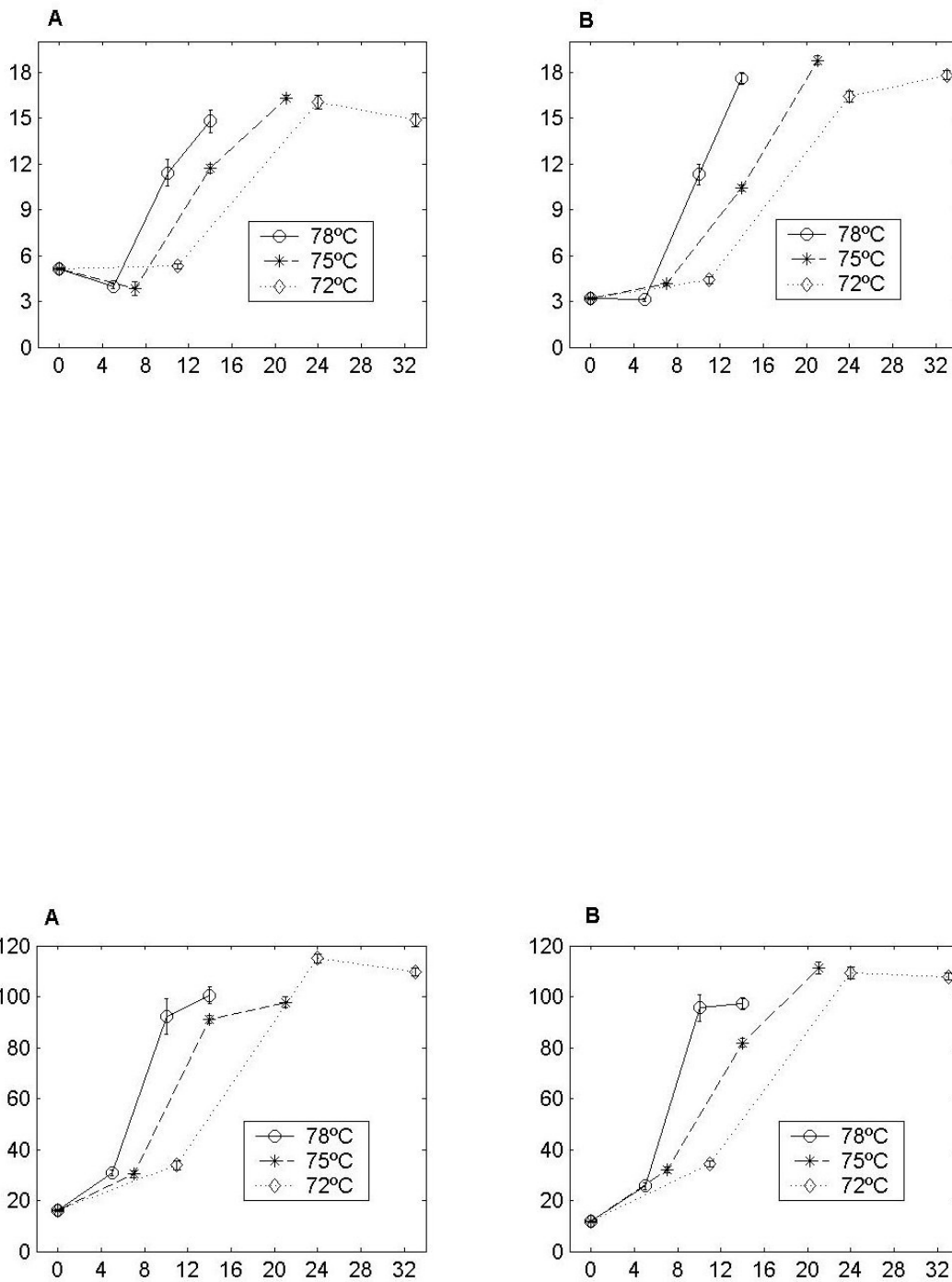


Figure 4. Evolution of polyphenol content (mean± SEM) in black garlic from whole bulbs (A) and peeled garlic cloves (B) during heat-treatment at different temperatures.

4. Conclusions

Black garlic differs from fresh garlic in its dark color, higher soluble solid values, lower pH and



higher concentration of polyphenols and antioxidant capacity. Small temperature variations in the processing (72, 75 to 78 °C) influence the speed of change; the higher temperature produces a quick rise in °Brix, the lowering of the pH, color change and increased polyphenol and antioxidant capacity.

Black garlic from previously peeled garlic is a similar product to the one traditionally manufactured. More research work is needed to study the difference between the black garlic made from whole bulbs and peeled garlic cloves.

References

1. Chia-Wen Tsai, Le- Yen Sheen, Chong-Kuei-Lii (2012). Garlic: Health benefits and action. *Biomedicine*, Volume 2 Issue 1, Pages 17–29.
2. Choi DJ, Lee SJ, Kang MJ, Cho HS, Sung NJ, Shin JH (2008). Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum* L.). *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* 37(4): 465-471.
3. Corzo-Martinez M, Corso N, Villamiel M (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science, Technology*, 18:609–625.
4. Jang EK, Seo JH & Lee SP (2008). Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. *Korean Society of Food Science and Technology* 40:443-448.
5. Lee, Y.-M., Gweon, O.-C., Seo, Y.-J., Im, J., Kang, M.-J., Kim, M.-J., Kim, J.-I., (2009). Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutrition Research and Practice* 3, 156.
6. Leyla Bayan, Peir Hossain Koulivand, Ali Gorji, (2014). Garlic: a review of potential therapeutic effects. *Avicena Journal of phytomedice* Vol. 4, No. 1, Jan-Feb , 1-14
7. Milner, J.A. (2010). Garlic and Cancer Prevention, in: Milner, J.A., Romagnolo, D.F. (Eds.), *Bioactive Compounds and Cancer, Nutrition and Health*. Humana Press, pp. 567–588.



8. Omar SH (2013). Garlic and Cardiovascular Diseases. Natural Products: Springer. 3661–3696.
9. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. Free Radic Biol Med., 26:1231–1237.
10. Sang Eun Bae, Seung Yong Cho,¹ Yong Duk Won, Seon Ha Lee, Hyun Jin Park, (2013). Changes in S-allyl cysteine contents and physicochemical properties of black garlic during heat treatment. Food Science and Technology 55 (2014) 397- 402
11. Sasaki, J., C. Lu, E. Machiya, M. Tanahashi and K. Hamada, (2007). Processed black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance anti-tumor potency against mouse tumors. Med. Aromatic Plant Sci. Biotech., 1(2): 278-281.
12. Sato, E., M. Kohno, H. Hamano and Y. Niwano, (2006). Increased anti-oxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation. Plant Food Hum. Nutr., 61: 157-160
13. Seo, Y.J., O.C. Gweon, J.E. Im, Y.M. Lee, M.J. Kang et al., (2009). Effect of garlic and aged black garlic on hyperglycemia and dyslipidemia in animal model of type 2 diabetes mellitus. J. Food Sci. Nutr., 14(1): 1-7.
14. Singleton VL, Orthofer R & Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin–Ciocalteu reagent. Meth Enzymol; 299, 152–178.
15. Wang, D., Y. Feng, J. Liu, J. Yan, M. (2010). Black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance the immune system. Med. Aromatic Plant Sci. Biotech., 4: 37-40.



ARTÍCULO 2.

“Influencia de la variedad y el tiempo de almacenamiento del ajo fresco en las propiedades fisico-químicas y fisiológicas del ajo negro”

M Ángeles Toledano Medina¹ ;Jesús Pérez-Aparicio ¹; Rafael Moreno-Rojas ⁴

Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Avda. Félix Rodríguez de la Fuente sn, Palma del Río,
Córdoba, 14700, Spain.

Department of Food Science and Technology. Campus Rabanales, Darwin Building. University of Córdoba. Spain

Resumen

El ajo negro es un producto originario de los países asiáticos que poco a poco se ha ido introduciendo en los países occidentales. Es un producto que se fabrica mediante un proceso industrial a partir de ajo fresco, sometándolo a una temperatura y humedad determinada durante un tiempo prolongado (aproximadamente un mes).

El talismán de este producto es sin duda su alto potencial antioxidante, entre otras muchas propiedades terapéuticas. Además su sabor dulce y algo ácido carece totalmente del residual sabor a ajo que provoca el ajo fresco.

La reciente expansión de este producto se ha dado en los últimos años gracias a la exportación y en otros casos a la propia fabricación en países con altos volúmenes de producción del ajo fresco. Este hecho hace que las producciones sean heterogéneas y que no haya valores estandarizados para el control de calidad del producto.

El principal objetivo de este estudio es evaluar el empleo de diferentes variedades de ajo producidas en España (var. Ajo Morado, var. Ajo Temprano, Var. Blanco Americano) así como ajos de diferentes tiempos de almacenamiento. Así se estudian algunos de los parámetros fisico-químicos que marcan la evolución del proceso de fabricación (pH, acidez, °Brix, azúcares reductores) así como la cantidad de polifenoles y la capacidad antioxidante. Los controles se realizaron en ajo fresco y a tres tiempos diferentes durante la fabricación del ajo negro.

Los datos obtenidos en este estudio revelan que la evolución de la fabricación del ajo negro a partir de diferentes variedades muestra un modelo muy similar. Los datos de los análisis en los diferentes controles muestran una evolución ascendente de acidez, azúcares reductores y ° Brix y un descenso del pH en todas las muestras.

En cuanto a la capacidad antioxidante se muestran diferencias en cuanto al valor máximo obtenido durante la fabricación..en los ajos cosechados en 2013 (es decir, almacenados durante un año en refrigeración) se alcanzan los valores máximos a los 21 días en las variedades Morado y Temprano mientras que en la variedad Blanco Americano se muestra el valor más alto de capacidad antioxidante alrededor del día 13 de envejecimiento. Sin embargo, en el ajo negro fabricado con ajo fresco de 2014 (sin almacenamiento frigorífico) se alcanzan los valores máximos a los 21 días en las todas las variedades utilizadas en este ensayo.

Los valores de concentración de polifenoles aumentan durante la fabricación en las tres variedades y los dos tipos de ajo utilizado, hecho que no concuerda con la disminución de la capacidad antioxidante en todas las muestras. Se concluye que son necesarios más estudios para aclarar cuestiones relativas a la caracterización fisiológica del producto ajo negro.

Introducción

El mercado mundial del ajo, cuyo cultivo se remonta a hace miles de años ha crecido en los últimos años. Diferentes variedades son cultivadas atendiendo principalmente a factores de producción y condiciones medioambientales, influyendo notablemente en la composición final del ajo (Espinoza et al 2010)

En España las variedades de ajo *Morado*, *Temprano* y *Blanco Americano* son las tres más cultivadas. Se diferencian en sus caracteres morfológicos y organolépticos y por tener diferentes tiempos de siembra y recolección.

Andalucía es la segunda región productora de España, destacando la provincia de Córdoba, el 70-75% del ajo sembrado en la campaña de 2013/2014 es de la variedad *Spring* o ajo temprano (morado o blanco), mientras que el 5-10% es de ajo blanco, siendo el 20% restante de ajo morado.

El colapso de los mercados de ajo fresco han obligado a productores de ajo a diversificar sus producciones obteniéndose numerosos productos derivados del ajo como son el ajo frito, ajo en polvo, extractos de ajo, aceite con ajo y la última novedad, el Black Garlic o ajo negro.

El ajo negro es obtenido mediante un proceso de calentamiento a temperatura y humedad determinado durante un período de tiempo variable Lee et al., 2009; Jeong et al 2013; Wang et al 2010; Lee et al 2011; Kang et al 2016; Sasaki et al 2007; Bae et al 2013; Jang et al 2008; Kim et al 2011; Kim et al 2013; Kim et al 2017; Seo et al 2009). El producto final es natural, sin aditivos añadidos que se caracteriza por su color negro, sabor agridulce con toque balsámico que recuerda a frutas pasas y carente de sabor típico a ajo que produce rechazo de mucho consumidores. Es un producto está teniendo un crecimiento exponencial en los últimos años en todo el mundo y su producción y comercialización está siendo todo un éxito. Su uso final es muy variable siendo un condimento casi indispensable en las cocinas de los mejores chef del mundo así como un alimento demandado por sectores de la población preocupadas por la salud (healthy people) e incluso prescrito por profesionales de la salud para prevenir y mejorar posibles enfermedades cardiovasculares, diabetes, obesidad, y procesos cancerígenos (Banerjee et al 2003; Bayan et al 2013; Tanamai et al 2004; Lee et al., 2009; Jeong et al 2013; Wang et al 2010; Lee et al 2011; Kang et al 2016; Sasaki et al 2007) .

El objetivo de este estudio fue evaluar la fabricación del ajo negro, utilizando tres variedades de ajo y con diferentes tiempos de almacenamiento en refrigeración. Para ello se utilizó como material vegetal tres de las variedades de ajo con mayor producción en España, utilizando dos tipos de ajo en cada una de las variedades seleccionadas: ajo fresco (ajo recolectado en 2014) y ajo con un año de

almacenamiento en frío (ajo recolectado en 2013).

Material y métodos

Material

Se seleccionaron tres variedades de ajo *Allium Sativum* cosechadas en la comarca del Suroeste de la provincia de Córdoba (España): *Morado*, *Blanco Americano* y *Temprano*. Se tomaron muestras de dos cosechas consecutivas de la tres variedades seleccionadas (2013 y 2014) para la fabricación de ajo negro al mismo tiempo. Todas las bandejas se sometieron a una temperatura de 72 ± 2 °C y humedad relativa próxima al 90%.

Se analizaron diferentes muestras de las tres variedades al comienzo y durante la fabricación del ajo negro (0, 14, 21 y 34 días). Las muestras obtenidas en cada control se dividieron en tres submuestras previo al pelado y triturado de las mismas. En cada muestreo se analizaron las siguientes propiedades físico-químicas y antioxidantes: contenido en sólidos solubles (*°Brix*), pH, acidez (% *ácido cítrico*), azúcares reductores, concentración de polifenoles totales y capacidad antioxidante.

Análisis de pH, contenido de sólidos solubles (°Brix), acidez y azúcares reductores

El análisis de pH se realizó directamente sobre la muestra triturada y homogeneizada utilizando un potenciómetro modelo *Crison Basic 20*.

Para la determinación del contenido en sólidos solubles (*° Brix*) fue necesario filtrar aproximadamente 5 gramos de la muestra triturada obteniéndose el jugo de la muestra. Se tomó una gota de este jugo y se realizó la lectura de los sólidos totales utilizando el *Refractómetro de Abbe*.

La acidez y los azúcares reductores de cada muestra se determinaron sobre un homogeneizado previo de la muestra con agua destilada. Se pesó aproximadamente 15 gramos de la muestra

triturada y se añadió agua destilada suficiente para facilitar homogeneizado (60-65 gramos aproximadamente). Se batió la mezcla para llevar a cabo el equilibrio y filtrándose con un colador sobre un vaso de precipitado.

Para la determinación de la acidez, expresada en % de ácido cítrico, se tomaron con una pipeta automática 10 ml del equilibrio obtenido previamente y se añadió agua destilada hasta llegar a 100 ml para facilitar la lectura de la acidez. Se midió la acidez mediante valoración potenciométrica (hasta alcanzar pH 8.1) con NaOH 0.25 N .La determinación de los azúcares reductores se realizó según el método de Rebelein

Para la determinación de los azúcares reductores con ayuda de una pipeta automática se 2ml de la muestra homogeneizada en un vaso de precipitado. Fue necesario realizar un proceso de defecación o decoloración defecar de la muestra antes del análisis para evitar la interferencia de otras sustancias con propiedades reductoras como son los polifenoles. Para ello, se añadieron 16 ml de agua destilada, 1 ml de Hexacianoferrato (II) de potasio trihidratado al 15% y 1 ml de sulfato de zinc al 30%. Se dejó reposar durante 10 minutos. A continuación se filtró sobre otro vaso de precipitado (segundo factor de corrección; $f_2=20/2$).

En un matraz erlenmeyer, se pipeteó 5 ml de la muestra defecada. Luego se añadió 15ml de Fehling A y 10ml de Fehling B tomando una coloración azul oscura. Se incorporaron unas piedras pómez. Se llevó este erlenmeyer a ebullición sobre una placa calefactora tapado con un vidrio reloj durante 2 minutos. Se apreció el color rojo del cobre reducido. Se enfrió bajo el grifo hasta alcanzar temperatura ambiente.

Se añadió en el erlenmeyer 10 ml de yoduro de potasio al 30% (preparar al día porque se estropea), 10ml de ácido sulfúrico al 16% (medio ácido) y 10ml de engrudo de almidón (indicador, añadir NaCl para su conservación) y se valoró con tiosulfato sódico 0,55 1N colocada en una bureta. De color negro pasa a blanco crema, considerando su punto final. (V')

Se hizo un blanco con todos los reactivos excepto la muestra que se sustituye por agua destilada. La diferencia entre el volumen V de tiosulfato gastado en el blanco y el V' gastado en la muestra es el contenido de azúcar expresado en g/Kg, teniendo en cuenta las diluciones llevadas a cabo (f1 y f2)

$$\text{Azúcar total, g/Kg} = (V - V')$$

Preparación de la curva de calibrado de azúcares reductores

Se preparó 100mL de una solución madre de glucosa 100g/l y a partir de ésta se prepararon 100mL de las siguientes: 1g/l, 2g/l, 3g/l, 4g/l, 5g/l, 10g/l, 15g/l y 20g/l pipeteando 1ml, 2ml, 3ml, 4ml 5ml, 10ml, 15ml y 20ml respectivamente de solución madre y enrasando con agua destilada. Se les realizó el mismo análisis obteniendo los siguientes resultados, incluyendo un blanco V=5,4mL

Se representó V-V'(mL) frente a Concentración (g/L) obteniéndose la recta de regresión (pasandola por el 0) de $f(x) = 3,6523 x$

Preparación del extracto para determinación de polifenoles y capacidad antioxidante

Las muestras obtenidas en cada control fueron liofilizadas en un liofilizador. Se pesó 0,3 gr de muestra en 10 ml de una solución al 50% v/v de etanol y agua destilada. Seguidamente las muestras se agitaron durante una hora en un carrusel giratorio . Posteriormente se filtraron empleando un embudo *buchner* con filtro whatman sobre matraz *kitasato* conectado a una bomba de vacío. El extracto filtrado se enrasó a 25 ml con una solución hidroalcohólica al 50% v/v. Se obtuvieron dos extracciones por cada muestra.

Concentración de Polifenoles, capacidad antioxidante y polifenoles totales

La concentración de polifenoles se determinó según el método de *Folin-Ciocalteu (Singleton, 1999)*. En un matraz aforado de 25 ml se añadió 0,5 ml de extracto, 10 ml de agua destilada, 1 ml de reactivo *Folin-Ciocalteu*, 3 ml de carbonato sódico al 20% p/v y se enrasó con agua destilada. La mezcla fue calentada a 50°C durante 5 minutos para acelerar la reacción de coloración.

Posteriormente, se enfrió con agua y se realizó la lectura en el espectrofotómetro a 765 nm. El resultado se comparó con una curva de calibrado elaborada a partir de disoluciones de ácido gálico de 75, 100, 200, 250, 300 ppm. Los resultados se expresaron considerando la dilución de la muestra (0,3 gr en 25 ml) en gramos de ácido gálico *equivalente* por kg de muestra liofilizada.

La capacidad antioxidante se determinó según el método del radical ABTS (Re et al., 1999; Zulueta et al., 2008) y se expresó en mmoles equivalentes al *Trolox*. Se prepararon 2,557 ml de una solución del reactivo ABTS 7 mM en agua destilada y se añadieron 0,333 ml de una solución persulfato potásico 2,5 mM en agua destilada. La solución preparada se almacenó en oscuridad durante 16 horas, tiempo necesario para la formación del radical (ABTS⁺). Seguidamente se diluyeron 0,15 ml de la solución ABTS⁺ en 15 ml de etanol y se ajustó su valor de absorbancia (A₀) a 734 nm en 0,7. En una cubeta de 1 cm de paso de luz se añadieron 0,980 ml de la solución ABTS⁺ y 0,02 ml de muestra de extracto. Se agitó y se tomó la lectura de absorbancia a 734 nm a los 7 minutos (A₁). El porcentaje de inhibición se calculó mediante la siguiente expresión:

$$\% \text{ inhibición} = (A_0 - A_1) * 100 / A_0$$

Seguidamente se construyó una curva de calibrado on las siguientes concentraciones de *Trolox*: 0,1; 0,5; 1 y 1,5 mM y se obtuvo el porcentaje de inhibición para cada concentración de *Trolox*. Considerando la dilución de la muestra los resultados se expresaron en mmoles equivalentes a *Trolox* por kg de muestra liofilizada.

Análisis estadístico

Los resultados obtenidos fueron analizados mediante *Análisis de Varianza* y comparando los valores medios a diferentes tiempos de proceso según *Tuckey*.

Resultados y discusión

En la tabla se muestran los valores obtenidos en el ajo fresco y en los controles durante la

fabricación de ajo negro (0, 14, 21 y 34 días) del contenido en *azúcares reductores*, *acidez*, *°Brix*, *pH*, *capacidad antioxidante* y *contenido de polifenoles* en las tres variedades de ajo utilizadas en el ensayo (*var Morado*, *Temprano* y *Blanco Americano*) y en los dos tipos de ajo según el momento de recolección (cosecha 2013 y cosecha 2014).

Han sido estudiados diferentes parámetros físico-químicos en diferentes variedades de ajo (Espinoza et al., 2009) . Recientemente se ha estudiado la influencia de la variedad en el proceso de fabricación del ajo negro atendiendo a la consecución de mayores valores de Selenio en el producto final, con el objetivo de obtener propiedades saludables mejoradas en el ajo negro (Calderón , 2015) Los análisis de varianza muestra diferencias estadísticamente significativas para todas las variedades estudiadas, tanto en ajos del año 2013 como del 2014.

Acidez, pH, °Brix y azúcares reductores

De forma general, se observó un aumento progresivo de los valores de acidez, azúcares reductores, sólidos solubles (°Brix) y un descenso significativo del pH del ajo durante el proceso de fabricación del ajo negro en todas las muestras analizadas en los diferentes controles. Estos datos son similares a los publicados por diferentes autores (Toledano-Medina, 2016, Lee et al., 2009; Jeong et al 2013; Wang et al 2010; Lee et al 2011; Kang et al 2016; Sasaki et al 2007; Baue et al 2013; Jang et al 2008; Kim et al 2011; Kim et al 2013; Kim et al 2017; Seo et al 2009)

Los valores iniciales de °Brix fueron diferentes en las tres variedades y en los dos tipos de ajo utilizado. Igualmente, se observa que el contenido en sólidos solubles (°Brix) aumentó significativamente durante el proceso de fabricación de ajo negro en las muestras analizadas de las tres variedades y en los dos tipos de ajo utilizado (véase figura 1).

En la tabla se observa que el valor de pH descendió significativamente en las tres variedades en el ajo fabricado con ajo de 2013 (*var Morado* 5,88 a 3,3; *var Temprano* 5,96 a 3,34; *var, Blanco Americano* 5,91 a 3,4) y con ajo de 2014 (*var Morado* 5,87 a 3,47; *var Temprano* 6,25 a 3,34; *var,*

Blanco Americano 5,91 a 3,54). La evolución del pH durante la fabricación del ajo negro fue muy similar en las tres variedades y en los dos tipos de ajo utilizado (véase gráfico 1), obteniéndose valores de pH finales iguales o inferiores a 3,5.

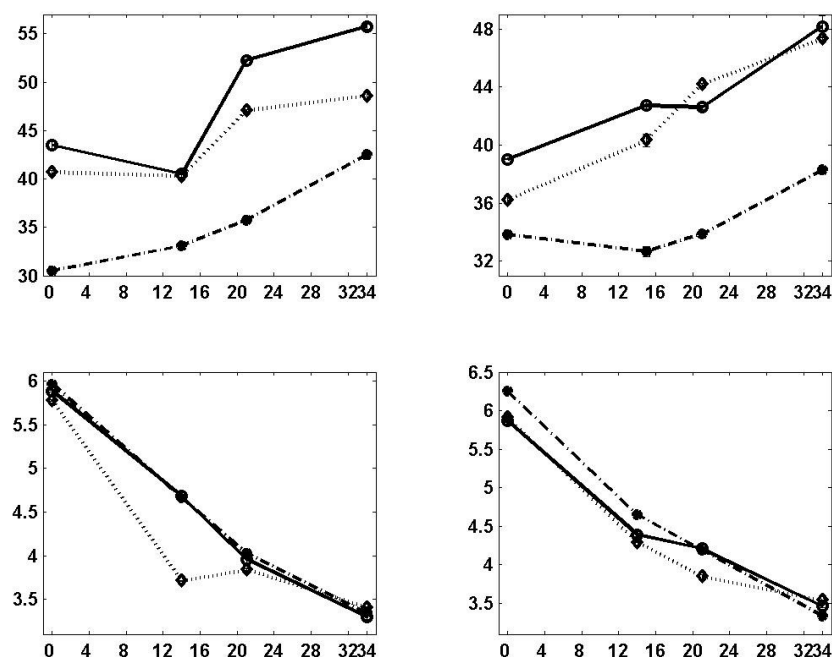


Figura 1. Evolución de °Brix durante la fabricación de ajo negro con ajos de 2013 (arriba a la izquierda) y 2014 (arriba a la derecha). Evolución de pH durante la fabricación de ajo negro con ajos de 2013 (abajo a la izquierda) y 2014 (abajo a la derecha)

var. Morado — var. Temprano - - - - var. Blanco Americano

Los valores de acidez en el ajo fresco de todas las variedades fueron inferiores al 1%. En la figura 2 se observa una subida significativa de la acidez en las tres variedades y en los dos tipos de ajo utilizado, alcanzando valores más elevados en la variedad Temprano seguida de la variedad Morado, y correspondiendo los valores más bajos de acidez en la variedad Blanco Americano

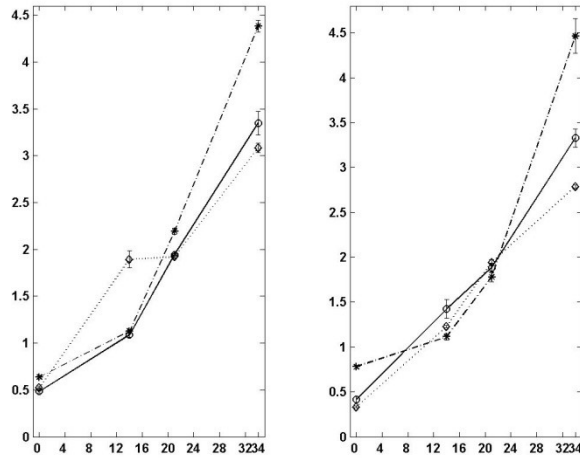


Figura 2. Evolución de la acidez durante la fabricación de ajo negro con ajos de 2013 (izquierda) y 2014 (derecha).

var. Morado — var. Temprano - - - - - var Blanco Americano

En la tabla 1 se reflejan los valores de azúcares reductores presentes en las diferentes muestras analizadas. En el figura 3 se muestra la evolución del contenido en azúcares durante la fabricación, observándose un aumento significativo de los valores iniciales. En las tres variedades y en los dos tipos de ajo utilizado se muestra una subida significativa hasta el control del día 21, a partir del cual los valores se mantienen constantes o aumentan en menor porcentaje.

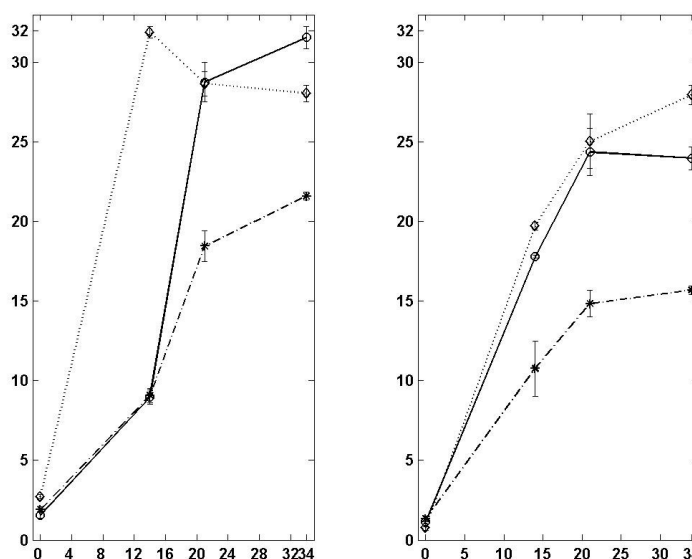


Figura 3. Evolución

de los azúcares reductores durante la fabricación de ajo negro con ajos de 2013 (izquierda) y 2014 (derecha).

var. Morado ——— var. Temprano - - - - var. Blanco Americano

Capacidad antioxidante y polifenoles

En la tabla se muestran los valores de la capacidad antioxidante en los diferentes muestreos realizados durante la fabricación del ajo negro. Se muestran valores muy diferentes en las tres variedades analizadas, coincidiendo los valores iniciales más elevado en los dos tipos de ajo procesado a la variedad Temprano ($62,61 \pm 3,37$; $85,22 \pm 5,6$ en ajo de 2013 y 2014 respectivamente).

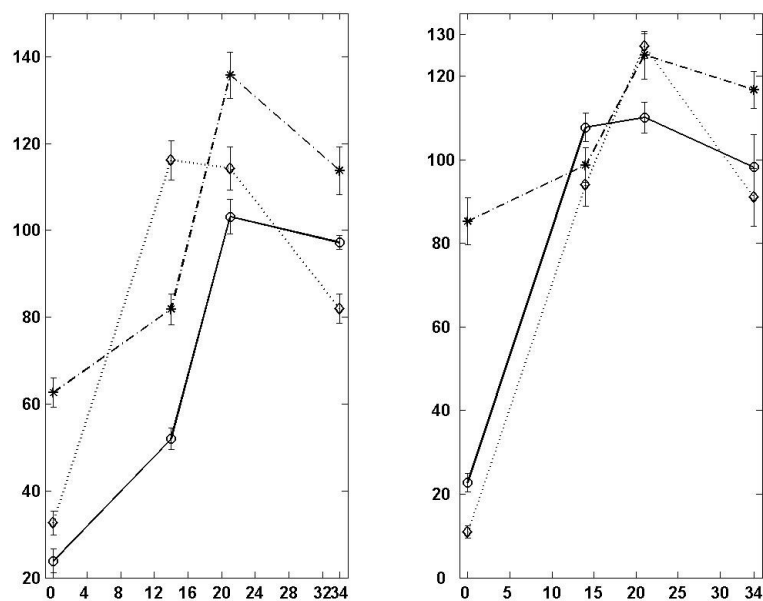


Figura 4.. Evolución de la capacidad antioxidante durante la fabricación de ajo negro con ajos de 2013 (izquierda) y 2014 (derecha).

var. Morado — var. Temprano . . — — var Blanco Americano

En la figura 4 se observa que los valores más altos en la capacidad antioxidante en todas las muestras analizadas se observan en el control a los 21 días de fabricación del ajo negro, momento tras el cual los valores globales de capacidad antioxidante empiezan a disminuir en todos los casos.

Al final del proceso, se muestra un aumento de la capacidad antioxidante diferente en las tres variedades. La variedad Morado es la variedad que muestra mayor aumento de la capacidad antioxidante en ambos tipos de ajo utilizado si se comparan los datos iniciales y finales del ajo, experimentando un aumento de 4 veces aproximadamente. La variedad Temprano parte de valores iniciales de capacidad antioxidante en el ajo fresco superiores a las otras dos variedades, aunque experimenta un incremento menor en la capacidad antioxidante si comparamos datos iniciales y finales. La variedad Blanco Americano parte de valores iniciales intermedios entre las dos

variedades, morada y temprano a la variedad Morada. Estos datos apoyan los datos aportados por diferentes trabajos de investigación que describía un aumento de los valores iniciales de 4,5 veces (Toledano- Medina et al , 2016, Lee et al., 2008)

En la tabla se muestran los valores iniciales de polifenoles en todas las muestras analizadas, mostrándose los valores iniciales más elevados en la variedad de ajo Temprano en los dos tipos de ajo utilizado.

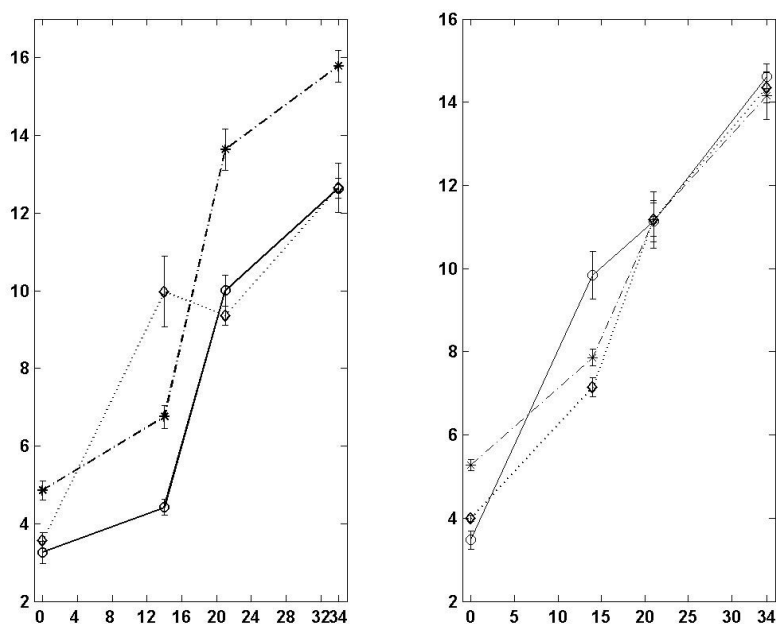


Figura 5. Evolución de polifenoles durante la fabricación de ajo negro con ajos de 2013 (izquierda) y 2014 (derecha).

var. Morado — var. Temprano - - - - var. Blanco Americano

En la figura 5 se muestra una evolución ascendente en la fabricación del ajo negro con muestras de 2013 en el contenido de polifenoles durante todo el proceso de fabricación, mostrándose diferencias más apreciables entre la variedad Temprano y las otras dos variedades estudiadas. Sin embargo, en el gráfico correspondiente a 2014 los valores de contenido de polifenoles alcanzados fueron muy similares en las tres variedades estudiadas.

Conclusión

Los datos obtenidos en este ensayo muestran que existen diferencias significativas en la fabricación de ajo negro con diferentes variedades y con ajos de diferente tiempo de almacenamiento. No obstante la evolución de las muestras estudiadas siguen el modelo descrito en otras publicaciones anteriores mostrando una evolución ascendente de los valores de acidez, Brix, azúcares, polifenoles y capacidad antioxidante y una disminución en el pH de producto.

Al comparar los diferentes gráficos obtenidos se aprecia coherencia entre la bajada de pH y una subida de la acidez del producto, así con el incremento de los azúcares y la cantidad de sólidos solubles presentes en las muestras, mostrándose este valor como una medid indirecta del dulzor del producto.

Al contrastar los valores de la capacidad antioxidante y la cantidad de polifenoles a partir del día 21 de fabricación se aprecia correlación negativa con los valores de polifenoles obtenidos en todas las muestras analizadas. Este hecho debería ser estudiado con otros ensayos, ya que al aumentar el contenido de polifenoles debería aumentar la capacidad antioxidante global del producto tal y como se refleja en numerosas investigaciones.

Se concluye que si el parámetro principal de seguridad del producto es que el pH tenga valores inferiores a 4 el proceso se podría parar en el control del día 21. De igual manera si se pretenden

conseguir los máximos valores de capacidad antioxidante el proceso de fabricación se debería para en este mismo momento.

La variedad Temprano mostró los valores más altos iniciales y finales de la capacidad antioxidante. Sin embargo, fue la variedad que mostró peor evolución de las características organolépticas del ajo negro: menor contenido en azúcares, Brix y la que alcanzó valores más ácido en el final del proceso

Tabla 1. Acidez, pH, sólidos solubles (° Brix), azúcares reductores, capacidad antioxidante y polifenoles de las variedades ajo Morado, Temprano y Blanco Americano en dos cosechas consecutivas (2013 y 2014) a tiempo inicial (t: 0) y en tres controles durante la evolución del proceso de fabricación de ajo negro (t: 14, t: 21 y t: 24)

	Acidez			pH			Brix		
	Var. Morado	Var. Temprano	Var. Blanco Americano	Var. Morado	Var. Temprano	Var. Blanco Americano	Var. Morado	Var. Temprano	Var. Blanco Americano
2013									
0	0,48±0,014a	0,64±0,02b	0,52±0,02a	5,88±0,01a	5,96±0,02b	5,78±0,01c	43,5±0,55a	30,5±0,15b	40,67±0,18c
14	1,09±0,02c	1,13±0,01c	1,89±0,1d	4,68±0,01d	4,66±0e	3,71±0,01f	40,5±0,56c	33,1±0,47d	40,3±0,1c
21	1,94 ±0,01d	2,19±0,03e	1,92±0,01d	3,96±0,05g	4,03±0,02g	3,84±0,01h	52,27±0,07e	35,77±0,09f	47,1±0,12g
34	3,35±0,13f	4,38±0,06g	3,08±0,05h	3,3±0,35i	3,34±0,2i	3,4±0,01j	55,75±0,25h	42,5±0,5i	48,6±0,36j
	***			***			***		
2014									
0	0,42±0,03a	0,79±0,02b	0,33±0,01c	5,87±0,05a	6,25±0,03b	5,91±0,02a	39,03±0,03a	33,83±0,20bb	36,23±0,19cc
14	1,42±0,11d	1,11±0,04e	1,23±0,01f	4,39±0,05c	4,65±0,0d	4,29±0e	42,73±0,30d	32,67±0,35e	40,33±0,43f
21	1,88±0,05gh	1,78±0,06g	1,94±0,03h	4,21±0,05f	4,19±0,01f	3,85±0,02g	42,60±0,15g	33,87±0,30h	44,17±0,09i
34	3,33±0,1i	4,46±0,19j	2,79±0,02k	3,47±0,02h	3,34±0,02i	3,54±0,01j	48,17±0,73j	38,28±0,17kk	47,33±0,08jj
	***			***			***		

	Azúcares			Capacidad Antioxidante			Polifenoles		
	Var. Morado	Var. Temprano	Var. Blanco Americano	Var. Morado	Var. Temprano	Var. Blanco Americano	Var. Morado	Var. Temprano	Var. Blanco Americano
2013									
0	1,57±0,18a	1,91±0,20a	2,72±0,14b	23,9±2,79a	62,61±3,37b	32,62±2,76c	3,26±0,29a	4,86±0,24b	3,56±0,20a
14	8,97±0,45c	9,07±0,43c	31,9±0,37*d	52,0±2,5d	81,85±3,52e	116,14±4,49f	4,42±0,20c	6,75±0,30d	9,97±0,91e
21	28,77±1,23e	18,46±0,99f	28,66±0,76e	103,11±4,0g	135,74± 5,37h	114,31±4,98f	10±0,40e	13,64±0,52f	9,36±0,25e
34	31,56±0,69d	21,61±0,25g	28,01±0,51e	97,21±1,6i	113,77±5,49f	81,99±3,32e	12,63±0,26g	15,79±0,41h	12,65±0,64g
	***			***			***		
2014									
0	1,17±0,33a	1,34±0,17a	0,81±0,20b	22,75±2,25a	85,22±5,6b	10,97±1,42c	3,48±0,22a	5,28±0,13b	4±0,08c
14	17,8±0,10c	10,77±1,73d	19,72±0,26e	107,68±3,39d	98,71±4,2b	94,07±5,17b	9,84±0,57d	7,86±0,20e	7,15±0,23f
21	24,37±1,48f	14,85±0,83g	25,05±0,71f	110,01±3,68d	125±5,7e	127,17±2,89e	11,14±0,5g	11,17±0,40g	11,17±0,68g
34	23,98±0,71f	15,7±0,28g	27,96±0,62h	98,21±7,82d	116,7±4,4e	90,99±6,85d	14,62±0,29h	14,16±0,58h	14,34±0,36h
	***			***			***		

1: variedad Morado; 2: variedad temprano; 3: variedad blanco americano
0: control inicial; 14: control a los 14 días; 21: control a los 21 días; 34: control a los 34 días

Bibliografía

1. Calderón P. R. del proceso de obtención de ajo negro a partir de distintas variedades de ajo. Universidad Técnica Estatal de Quevedo, Ecuador, 2015.



2. Choi DJ, Lee SJ, Kang MJ, Cho HS, Sung NJ, Shin JH (2008). Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum* L.). *J. Korean. Soc. Food Sci. Nutr.* 37(4): 465-471.
3. Dušica P. Ilić , Vesna D. Nikolić, Ljubiša B. Nikolić, Mihajlo Z. Stanković, Ljiljana P. Stanojević,
4. Espinoza Cáceres, F. W., Ríos Ríos, E. M^a. & Elías Peñafiel, C. C. A. 2010. Determinación de fenoles totales, fructanos y pungencia en seis cultivares de ajos (*Allium sativum* L.) en el Perú. *Revista Sociedad Química del Perú*, 76 (1): 101-109.
5. García Gómez, L. J. & Sánchez Muniz, F. J. 2000. Revisión: Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, 50(3): 219-229.
6. Gómez Estrada, H. A., González Ruiz, K. N. & Medina, J. D. 2011. Actividad Antiinflamatoria de Productos Naturales. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 10(3): 182-217.
7. Jang EK, Seo JH & Lee SP (2008). Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. *Korean Society of Food Science and Technology* 40:443-448.
8. Kahn, G. (1996) History of garlic. Koch, H. P. Lawson, L. D. eds. *Garlic: The Science and Therapeutic Application of Allium sativum L. and Related Species* :25-36
9. Kimura, Shunsuke et al. 2017 Black garlic: A critical review of its production, bioactivity, and application *Molecules*
10. Lawson, L. D. (1998) Garlic: a review of its medicinal effects and indicated active compounds. In: *Phytomedicines of Europe. Chemistry and Biological Activity*. ACS Symposium Series 691 (Lawson, L. D. & Bauer, R., eds.), pp. 176–209. American Chemical



Society, Washington, DC .

11. Lee, Y.-M., Gweon, O.-C., Seo, Y.-J., Im, J., Kang, M.-J., Kim, M.-J., Kim, J.-I., (2009). Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutrition Research and Practice* 3, 156.
12. Milner, J.A. (2010). Garlic and Cancer Prevention, in: Milner, J.A., Romagnolo, D.F. (Eds.), *Bioa*
13. Muñoz Jáuregui A.M. & Ramos Escudero F. 2007. Componentes fenólicos de la dieta y sus propiedades biomedicinales. *Revista Horizonte Médico*, 7(1): 23-31.
14. Ortega Mata, M. 2000. Los antioxidantes en los alimentos. Monografías de la Real Academia Nacional de Farmacia. Monografía VI. Alimentación y salud. Real Academia Nacional de Farmacia. Madrid.
15. Re R, Pellegrini N, Proteggente A, Pannala A, Yang M, Rice-evans C (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radic Biol Med.*, 26:1231–1237.
16. Sang Eun Bae, Seung Yong Cho,¹ Yong Duk Won, Seon Ha Lee, Hyun Jin Park, (2013). Changes in S-allyl cysteine contents and physicochemical properties of black garlic during heat treatment. *Food Science and Technology* 55 (2014) 397- 402
17. Sasaki, J., C. Lu, E. Machiya, M. Tanahashi and K. Hamada, (2007). Processed black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance anti-tumor potency against mouse tumors. *Med. Aromatic Plant Sci. Biotech.*, 1(2): 278-281.
18. Sato, E., M. Kohno, H. Hamano and Y. Niwano, (2006). Increased anti-oxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation. *Plant Food Hum. Nutr.*, 61: 157-160
19. Seo, Y.J., O.C. Gweon, J.E. Im, Y.M. Lee, M.J. Kang et al., (2009). Effect of garlic and aged



- black garlic on hyperglycemia and dyslipidemia in animal model of type 2 diabetes mellitus. *J. Food Sci. Nutr.*, 14(1): 1-7.
20. Shin, J.H.; Choi, D.J.; Lee, S.J.; Kwon, O.C.; Cha, J.Y.; Sung, N.J. Antioxidant activity of black garlic (*Allium sativum*). *J. Korean Soc. Food Sci. Nutr.* 2008, 37, 965–971
21. Singleton VL, Orthofer R & Lamuela-Raventos RM (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin–Ciocalteu reagent. *Meth Enzymol*; 299, 152–178.
22. Toledano-Medina, M.A., Perez-Aparicio, J., Moreno-Rojas, R., and Merinas-Amo, T. Evolution of some physicochemical and antioxidant properties of black garlic whole bulbs and peeled cloves. *J Food Chem.* 2016; 199: 135–139
23. Wang, D., Y. Feng, J. Liu, J. Yan, M. (2010). Black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance the immune system. *Med. Aromatic Plant Sci. Biotech.*, 4: 37-40.
24. Zhang, X., Li, N., Lu, X., Liu, P., and Qiao, X. Effects of temperature on the quality of black garlic. *J Sci Food Agric.* 2015; 96: 2366–2372



ARTÍCULO 3

”Characterisation of physico-chemical and biological activities of black and white garlic: *in vivo* and *in vitro* assays”

M Ángeles Toledano Medina¹ ; Tania Merinas-Amo²; Zahira Fernández-Bedmar^{2 4}; Ángeles Alonso-Moraga² ; Jesús Pérez-Aparicio ¹; Rafael Moreno-Rojas ⁴

Instituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Avda. Félix Rodríguez de la Fuente sn, Palma del Río, Córdoba, 14700, Spain.

Department of Genetics. Campus Rabanales, Gregor Mendel Building. University of Córdoba. Spain.

Department of Food Science and Technology. Campus Rabanales, Darwin Building. University of Córdoba. Spain

Abstract

Much research is focused on the health promoting properties of garlic. White and three types of black garlic (with 13, 32 and 45 days of fermentation, named 0C1, 1C2 and 2C1 respectively) were selected in order to check some possible differences in their nutraceutical potential. For this purpose, the four types of garlic were physico-chemically characterised, and both *in vivo* (toxi/antitoxicity, geno/antigenotoxicity and longevity trials in *Drosophila melanogaster* model) and *in vitro* (cytotoxic and proapoptotic DNA internucleosomal fragmentation potential in HL-60 human leukaemia cell line) assays were carried out. Black garlic showed high polyphenol content (2.5 - 4-fold than white garlic) and antioxidant capacity (6 - 7-fold than white garlic). The biological studies have shown that all types of garlic were safe without showing toxicity, although they did not exert protective effects against the oxidative toxin hydrogen peroxide, with the exception of 0C1 black garlic (13 days aged). All raw and processed garlic material were non-genotoxic with the exception of the higher concentration of white garlic. On the other hand, the most antigenotoxic substance was 0C1 (13 days aged) when the imaginal discs are treated with the genotoxine hydrogen peroxide in combination with raw garlic. The *in vivo* longevity assays yielded significant extension of lifespan results in some of the tested concentrations of white and 0C1(13 days aged) and 1C2 (32 days aged) black garlic. Finally, the results achieved in the *in vitro* experiments for garlic cytotoxicity were hopeful. All studied garlic induced a decrease in leukaemia cells growth with different inhibition

concentrations ranging from 0.02 to 1 mg/ml. However, none type of garlic was able to induce proapoptotic internucleosomal DNA fragmentation. Taking both the physicochemical and biological data, the 13 days aging black garlic could reveals as the best nutraceutical. Our findings are relevant for the black garlic processing agrifood companies as the economical and timing costs are significantly reduced to 13 days aging. The sector should know that black garlic obtained with less cost yield better index of biological activities than others needing more time and processing costs.

Keywords

Black Garlic; *Drosophila melanogaster*; Physico-chemical profile; Polyphenol content; HL-60 cell line.

Chemical compounds

ABTS reagent (PubChem CID: 92045357); Agarose (PubChem CID: 11966311); Etanol (PubChem CID: 702); Ethidium bromide (PubChem CID: 14710); Gallic acid (PubChem CID: 370); Hydrogen peroxide (H₂O₂) (PubChem CID: 784); L-glutamine (PubChem CID: 5961); Potassium persulfate (PubChem CID: 24412); Trolox (6541354); Trypan blue (PubChem CID: 101417452).

RPMI-1640 medium (Sigma, R5886); heat-inactivated foetal bovine serum (Linus, S01805); antibiotic-antimycotic solution (Sigma, A5955); Folin-Ciocalteu reagent; Carbonate sodium 20 % w/v; hydroalcoholic solution of 50 % v/v.

Abbreviations

°Brix	Soluble solids content
0C1	13 days aged black garlic
1C2	32 days aged black garlic
2C1	45 days aged black garlic

a_w	Water activity
DADS	Diallyl disulphide
DAS	Diallyl sulphide
DATS	Diallyl trisulphide
flr^3	<i>flare</i> genetic marker
HL-60	Human leukaemia-60 cell line
IC ₅₀	Inhibitory concentration 50
<i>L</i>	Browning intensity
<i>mwh</i>	<i>multiple wing hairs</i> genetic marker
RH	Relative Humidity
SAC	S-allyl-L-cysteine
SMART	Somatic Mutation And Recombination Test

Formatting of funding sources

This research did not receive any specific grant from funding agencies in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

1. Introduction

Garlic (*Allium sativum*) is probably one of the oldest medicinal plants known, used from ancient time to cure different disease conditions in humans. Garlic started taking part in the daily diet since Egyptians age (Block, 1985). Several scientific research and clinical trials have been conducted during the last decade to determine the effects of garlic consumption. Garlic's principal medicinal uses focussed on prevention and treatment of cardiovascular disease by lowering blood pressure and cholesterol, and, more recently, both as an antimicrobial and preventive agent for cancer (Rivlin, 2006; Tattelman, 2005).

The physiological effects of garlic are mainly due to the presence of volatile sulfur compounds like thiosulfates which give it the characteristic pungent aroma (Agarwal, 1996). Several recent studies have shown that these organosulfur compounds have anti-cancer, anti-cardiovascular, anti-neurological, and anti-liver disease effects, as well as effects for prevention of allergy and arthritis (Amagase, Petesch, Matsuura, Kasuga, & Itakura, 2001; Cerella, Dicato, Jacob, & Diederich, 2011; Corzo-Martínez, Corzo, & Villamiel, 2007; Chowdhury et al., 2008). This group of compounds, originated from the allicin decomposition, was associated to the *Allium sp.* pungent aroma and taste and to an antioxidant activity (Amagase et al., 2001; Brodnitz & Pascale, 1971). However, garlic should be consumed in appropriate amount because cytotoxicity was reported at high doses (S. H. Kim et al., 2012).

Black garlic products have emerged as one of the fastest-growing health-oriented food product in world markets with the growing awareness of the health benefits of garlic (Bae, Cho, Won, Lee, & Park, 2012). Thermal processes are commonly used in food manufacturing. One of the important objectives of thermal processes is to raise the sensory quality of foods, their palatability and to extend the range of colours, tastes, aromas and textures in food (Capuano & Fogliano, 2011). In addition, heating processes lead to the formation of biological compounds that are not originally

present in food (Shinkawa et al., 2009). However, influences of thermal processes on the concentration of single flavonoids and phenolic acids in garlic are unknown.

Black garlic is produced through natural fermentation by aging whole ordinary garlic under controlled high temperature (70 °C) and humidity condition (90 %) for several days without any artificial treatments and additives (Jang, Seo, & Lee, 2008). During the aging production, the cloves of normal garlic change its colour from white to brown and finally became black, caused by the Maillard Reaction. The properties beneficial to health of black garlic have been described in many research works (S. H. Kim et al., 2012; E. N. Lee et al., 2011; Purev, Chung, & Oh, 2012; Seo et al., 2009; X. Wang et al., 2012). Compared with fresh garlic, the black one contains sevenfold polyphenol content (Sato, Kohno, Hamano, & Niwano, 2006), which indicated the increase in the antioxidant activity. The amino acid, the carbohydrate and the S-allyl-L-cysteine contents are increased in 2.5-fold, 28.7 - 47.0 % and 8 times respectively (Feng-chao, 2012; Sasaki, Lu, Machiya, Tanahashi, & Hamada, 2007). Black garlic exhibited a wide range of biological activities, such as antioxidant (S. H. Kim et al., 2012), anticancer (Seo et al., 2009), hypoglycemic (X. Wang et al., 2012), hypolipidemic (I. Kim et al., 2011), antiinflammatory (E. N. Lee et al., 2011), hepatoprotective (M. H. Kim et al., 2011) and immunostimulatory (Purev et al., 2012). Furthermore, black garlic shows stronger antioxidant activity *in vivo* (Bingqiao, Haige, & Yuanyuan, 2008) and higher free radical scavenging properties *in vitro* (S. H. Kim et al., 2012) compared with fresh garlic. Black garlic has soft, sour and fruit-like sweetness, comestible just by peeling without any unpleasant smell in it (E. N. Lee et al., 2011; D. Wang et al., 2010). These organoleptic characteristics are due to the conversion that unstable and odorous compounds of raw garlic to stable and odorless compounds such as S-allyl-L-cysteine (SAC) or decomposed to organosulfur compounds such as diallyl sulphide (DAS), diallyl disulphide (DADS), diallyl trisulphide (DATS), dithiins and ajoene (Amagase, 2006; Corzo-Martínez et al., 2007). During heat-treatment, unstable

compounds in raw garlic are transformed into stable soluble compounds with a high antioxidant power (Corzo-Martínez et al., 2007; Imai et al., 1994). Previous studies on black garlic reported that this increase in its antioxidant capacity could be due to the increase in polyphenols and S-allyl-cysteine, a compound derived from alliin (Y. M. Lee et al., 2009).

The aim of the present study is to perform a qualitative and quantitative evaluation of the health-beneficial properties of white and three types of black garlic, using a multi-assay experimental design at the individual, cellular and DNA levels. We assessed on their genotoxic, antigenotoxic and lifespan effects in an *in vivo* animal model (*Drosophila melanogaster*) and their proapoptotic capacities against cancer processes: cytotoxicity and clastogenic DNA activity using an *in vitro* human cancer model (HL-60 cell line).

Drosophila melanogaster is an excellent model organism to the study of aging, due to its relatively short life expectancy; a large number of individual can be in controlled laboratory conditions and because adults show many aspect of the cellular senescence observed in mammals (Fleming, Reveillaud, & Niedzwiecki, 1992). Thus flies have been used frequently to study physiological and pathological processes that affect life expectancy, and can help to understand the relationship between nutrient metabolism and the mechanisms of aging (Li, Edgar, & Grewal, 2010).

The HL-60 cell line belongs to the undifferentiated immortal lines, as they are tumoral cells. It is widely investigated as a model for inducible cell differentiation (Breitman, 1990). This phenomenon might affect the cell ability to proliferate and therefore their immortality with the appearance of apoptosis (Anazetti, Melo, Durán, & Haun, 2003). Compounds capable to induce differentiation and apoptosis are candidates to act as chemopreventive agents or cancer chemotherapeutic (W. K. Hong & Sporn, 1997).

2. Material and methods

2.1.- Preparation of Samples

White and black garlic were selected for this study. White garlic was purchased in a local market. Black garlic was manufactured at 60 °C and 90 % RH. Samples at 0 (White), 13 (0C1), 32 (1C2) and 45 (2C1) days were taken during the manufacturing process. After peeling bulbs, samples were crushed and divided into three sub-samples. Before to carry out the biological assays, garlic were lyophilized and dissolved in distilled water in order to obtain the different concentrations tested. The lyophilized extracts were stored, until use, at room temperature in a dark and dried atmosphere.

The concentrations of garlic for the bioassays were established taking into account the average daily food intake of *D. melanogaster* (1 mg/day) and the average body weight of *D. melanogaster* individuals (1 mg). The concentration range for all tested substances was calculated in order to make it comparable to fit them into the recommended garlic daily intake for humans. Although there is no standard intake for garlic, the 1988 German Kommission E monograph (Blumethal, Busse, & Goldberg, 1998) proposed that daily intake of approximately 1 - 2 garlic cloves (about 4 g) of intact garlic may have benefits on health. Unfortunately, this recommendation is not substantiated by any scientific reference.

2.2.- Measurement of soluble solid content, pH, a_w , and Browning intensity

Total soluble solid content (°Brix), pH, water activity (a_w), and browning intensity (L value) were determined in all samples during heat treatment. Determinations in triplicate were carried out. Garlic soluble solids (°Brix) were measured by an *Abbe Refractometer*. Garlic pH was measured with a pH meter *Crison Basic 20*. Garlic water activity (a_w) was measured with an *Aqualab Series 3/3TE* meter with a temperature stabilizer. Garlic browning intensity was determined by a *Konica Minolta CR-410 Croma Meter colorimeter* as L value ($L=100$, white; $L=0$, black).

2.3.- Total polyphenol content and antioxidant capacity

A *Perkin Elmer Lambda 20 UV VIS spectrophotometer* was used to analyze raw and heated garlic, total polyphenol content and antioxidant capacity. A previous garlic extraction was prepared to analyze antioxidant properties. Briefly, samples were lyophilized and five extracts per sample were obtained. Garlic extract was prepared dissolving 0.3 g of the lyophilized sample in 10 ml of a mixture at 50 % v/v of ethanol and distilled water. Next, samples were stirred during one hour and then filtered using a Buchner funnel with *Whatman paper* into a vacuum flask connected to a vacuum pump filter. The filtered extract was leveled at 25 ml with a hydroalcoholic solution of 50 % v/v.

The polyphenol concentration of garlic samples was determined by *Folin-Ciocalteu* method (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventós, 1999). To a volumetric 25 ml flask, 0.5 ml of extract, 10 ml of distilled water, 1 ml of *Folin-Ciocalteu* reagent and 3 ml of carbonate sodium 20 % w/v were added, and diluted to volume (25 ml) with distilled water. The mixture was heated at 50 °C during 5 minutes to accelerate the coloration reaction. Subsequently, it was cooled with water and the reading was performed in the *spectroPHOTO"meter* at 765 nm. The reading was compared to a calibration curve prepared with different gallic acid solutions: 75, 100, 200, 250, 300 ppm. Polyphenol content results were expressed considering the dilution of the sample (0.3 g in 25 ml) in grams of gallic acid equivalent per kilogram of lyophilized sample.

Raw and heated garlic antioxidant capacity was determined by *ABTS radical method* (Re et al., 1999). A mix of 2.557 ml of a solution of 7 mM *ABTS reagent* and 0.333 ml of a solution of 2.25 mM potassium persulfate in distilled water was made. The prepared solution was stored in darkness during 16 hours, enough time for the radical formation ($ABTS^+$). Then, 0.15 ml of the $ABTS^+$ solution was diluted in 15 ml of ethanol. The absorbance value at 734 nm was adjusted near 0.7 (A_0). Next, 0.980 ml of $ABTS^+$ solution and 0.02 ml of garlic extract sample were added. After

stirring it, the absorbance was read at 734 nm after 7 minutes (A_1). The inhibition percentage was calculated by the following expression:

$$\% \text{ inhibition} = (A_0 - A_1) * 100 / A_0$$

A calibration curve was built with the following Trolox concentrations: 0.1; 0.5; 1 and 1.5 mM. Considering the sample dilution, results were expressed in mmolTrolox-equivalent per kilogram of lyophilized sample.

2.3.1. Statistical analysis

The statistical analysis of the solid content, pH, a_w , browning intensity, polyphenol content, antioxidant capacity and total polyphenol index for each type of garlic was evaluated with the SPSS Statistics 17.0 software, using the one-way ANOVA method. The significance of the subsets was determined using the Tukey HSD method (Homogeneous Subsets).

2.4.- *In vivo* assays

2.4.1. *Drosophila melanogaster* strains

The following *Drosophila* strains, each carrying a hair marker on the third chromosome, were used: (i) *mwh/mwh*, with the recessive mutation *multiple wing hairs* (*mwh*) that produces multiple trichomas per cell instead of one (Yan et al., 2008), and (ii) *flr³/In (3LR) TM3, rip^psep bx^{34e}e^sBd^S*, where the *flr³* (*flare*) marker is a homozygous recessive lethal mutation that produces deformed trichomas but is viable in homozygous somatic cells once larvae start the development (Ren, Charlton, & Adler, 2007). For detailed information of mutations, see Lindsley and Zimm (2012).

2.4.2. Toxicity and antitoxicity assays

In the toxicity assays five concentrations (4, 2, 1, 0.5 and 0.25 mg/ml) for each tested garlic, and a negative (H_2O) and positive (0.12 M H_2O_2 , Sigma, H1009) controls were assayed. Toxicity index

was expressed as the percentage of the number of individuals born in each treatment with respect to the number of individuals born in the negative control were analysed. The antitoxicity tests consisted of combined treatments using the same concentrations as in toxicity assays, with the exception of the highest one of 4 mg/ml, by adding the genotoxicant hydrogen peroxide at 0.12 M (Tasset-Cuevas et al., 2013).

2.4.2.1. Statistical analysis

The effects of the different toxicity/antitoxicity concentrations assayed were evaluated by mean of a Chi-square test by comparing the treatments with the negative/positive controls respectively.

2.4.3. Genotoxicity and Antigenotoxicity assays

The genotoxicity assays were carried out following the method described by Graf et al. (1984). Briefly, trans-heterozygous larvae for *mwh* and *flr*³ genes were obtained by crossing four day-old virgin *flr*³ females with *mwh* males in a 2:1 ratio. Four days after fertilization, females were allowed to lay eggs in fresh yeast medium (25 g of yeast and 4 ml of sterile distilled water) for 8 h in order to obtain synchronized larvae. After 72 ± 4 h, larvae were collected, washed with distilled water to remove the remaining medium, and transferred, in groups of 100 individuals, to the treatment tubes where they were fed chronically with the different compounds. The treatment tubes contained 0.85 g of *Drosophila* Instant Medium (Formula 4-24, Carolina Biological Supply, Burlington, NC) and 4 ml of solutions with different concentrations of garlic (2 mg/ml and 0.25 mg/ml).

The antigenotoxicity trials were carried out following the method described by Graf, Abraham, Guzman-Rincon, and Wurgler (1998), which consisted of combined treatments of genotoxin (0.12 M H₂O₂) and the same concentrations used in genotoxicity assays of lyophilized garlic. For significance and evaluation of the inhibition potency, negative (H₂O) and positive (0.12 M H₂O₂) controls were carried out. After emergence, adult flies were stored in 70 % ethanol until the wings

were removed, mounted on slides using Faure's solution to the scrutiny of the mutations under photonic microscope at 400x magnification.

2.4.3.1. Mutations scoring, data evaluation and statistical analysis

Similar numbers of male and female wings for each treatment and concentration were mounted and wing hair mutations were scored from a total of 24,400 monotricoma wild type cells per wing (Moraga & Graf, 1989).

Wing hair spots were grouped into three different categories: *S*, a small single spot corresponding to one or two cells clones exhibiting the *mwh* phenotype that occur in the late stages of the mitotic division; *L*, a large single spot with three or more cells clones showing *mwh* or *flr³* phenotypes and occur in the early stages of larval development; or *T*, a twin spot corresponding to two juxtapositioning clones, one showing the *mwh* phenotype and other the *flr³* phenotype. Small and large spots are originated by somatic point mutation, chromosome aberration, and somatic recombination, while twin spots are produced exclusively by somatic recombination between the *flr³* locus and the centromere.

The total number of clones was also annotated and a multiple-decision procedure was applied to determine whether a result is positive, inconclusive or negative (Frei & Wurgler, 1988, 1995). The frequency of each type of mutant clone/wing was compared with the concurrent negative control and the significance was taken at the 5 % level. Inconclusive and positive results were further analysed with the nonparametric *U*-test of Mann Whitney and Wilcoxon ($\alpha = \beta = 0.05$). The inhibition percentages (IP) for the combined treatments are calculated from total spots per wing with the following formula (S. K. Abraham, 1994):

$$IP = [(single\ genotoxin - combined\ treatment) / single\ genotoxin] \times 100$$

2.4.4. Lifespan assays

In order to compare genotoxicity and longevity results, flies who undergo the lifespan trials exhibited the same genotype as in genotoxicity assays. Hence, the F1 progeny from *mwh* and *flr*³ parental strains produced by a 24 h egg-laying in yeast medium was used in longevity experiments. All experiments were carried out at 25 °C according to the procedure described in Tasset-Cuevas et al. (2013). Briefly, synchronized 72 ± 12 hours old trans-heterozygous larvae were washed, collected and transferred in groups of 100 individuals into test vials containing 0.85 g of *Drosophila* Instant Medium and 4 ml of the different concentrations of the compounds to be assayed.

Sets of 25 emerged individuals of the same sex were selected and placed into sterile vials containing 0.21 g of *Drosophila* Instant Medium and 1 ml of the different concentrations of solution of the compounds to be tested (4 mg/ml - 0.25 mg/ml). Two replicates were followed during the complete life extension for each control and concentrations established. Alive animals were counted and media renewed twice a week.

2.4.4.1. Statistical analysis

The statistical treatment of survival data for each control and concentration was assessed with the SPSS Statistics 17.0 software (SPSS, Ink., Chicago), using the Kaplan-Meier method. The significance of the curves was determined using the Log-Rank method (Mantel-Cox).

2.5.- *In vitro* assays

2.5.1. HL-60 cell line culture conditions

Cells were grown in RPMI-1640 medium (Sigma, R5886) supplemented with 50 ml heat-inactivated foetal bovine serum (Linus, S01805), L-glutamine at 200 mM (Sigma, G7513) and antibiotic-antimycotic solution with 10.000 units of penicillin, 10 mg of streptomycin and 25 µg

amphotericin B per ml (Sigma, A5955). Cells were incubated at 37 °C in a humidified atmosphere of 5 % CO₂ (Shel Lab, Cornelius, OR, USA) (Gallagher et al., 1979). The cultures were plated at 2.5 x 10⁴ cells/ml density in 10ml culture bottles and passed every 2 days.

2.5.2. Cytotoxicity assay

HL-60 cells were placed in 96 well culture plates (2 x 10⁴ cells/ml) and treated for 72 h with the lyophilized white and black garlic at different concentrations (4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml, 0.25 mg/ml, 0.12 mg/ml, 0.06 mg/ml, 0.03 mg/ml and 0.015 mg/ml for white garlic and 4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml and 0.25 mg/ml for black garlic). This wide range of tested concentrations intended to estimate the cytotoxicity inhibitory concentration 50 (IC₅₀).

Cell viability was determined by the trypan blue dye (Sigma, T8154) exclusion test. Trypan blue was added to the cell cultures at a 1:1 volume ratio and 20 μ l of cell suspension was loaded into a Neubauer chamber. The cells were counted with an inverted microscope at 100x magnification (AE30/31, Motic). Curves were plotted as survival percentage with respect to the control growing at 72 h. At least three independent repetitions of the assays were carried out to calculate means for statistical analysis.

2.5.2.1. Statistical analysis

In order to obtain the tumoral growth inhibition curves, the mean of three independent assays of the alive treated cells for each compound and concentration was used. The standard errors of the three replicas were calculated and the curve given by the Excel program was added. Finally, an estimation of inhibitory concentration 50 (IC₅₀) was calculated.

2.5.3. Determination of DNA fragmentation

DNA fragmentation is a hallmark of apoptosis and has been regarded as a critical process in apoptosis (Nagata, 2000). Briefly, HL-60 cells (1 x 10⁶ cells/ml) were treated with different

concentrations of lyophilized garlic (4 mg/ml, 2 mg/ml, 1 mg/ml, 0.5 mg/ml and 0.25 mg/ml, respectively) for 5 h. Treated cells were collected and centrifuged at 3,000 rpm for 5 min, and DNA was extracted with lysis, precipitation and wash steps according to Merinas-Amo et al. (2013). The total extracted DNA was quantified in a spectrophotometer (Nanodrop[®] ND-1000) and 1200 ng of DNA were loaded into a 2 % agarose gel electrophoresis, stained with ethidium bromide and visualized under UV light.

3. Results and Discussion

3.1. Soluble solids content, pH, water activity, and Browning intensity

A weight reduction was observed during the different garlic procedure being the 0C1 black garlic the sample with the nearest weight with respect to the white garlic. According to similar studies in garlic, the changes in the garlic weight during the processing are mainly caused by a reduction of the water quantity in the black garlic (Sasaki et al., 2007). The most important organosulfur substance in black garlic are considered to be the water-soluble S-allyl-L-cysteine (SAC) (Jones et al., 2007). Hence, after aging of garlic, SAC increased in the processed black and its precursor garlic-γ-Glutamyl-S-allyl-L-cysteine decreased. The creation of black garlic in this manner is not a microbe-associated fermentation, but a Maillard and Browning reaction, because the processing temperature of garlic was do not allow bacterial growth to elicit fermentation (Sasaki et al., 2007).

Soluble solids content (°Brix), pH, water activity (a_w) and browning intensity (L) are shown in Table 1. During heat-treatment, soluble solid content increased in garlic whereas its pH, a_w and browning intensity decreased. Similar Tukey tests were showed in °Brix readings between white and 0C1 black garlic (40.47), meanwhile significant soluble solids content differences were observed in the 1C2 and 2C1 black garlic (43.17 and 45.67, respectively). The sugar content (°Brix) of black garlic increased. This result is in agreement with the data of D.-J. Choi et al. (2008), which show that

sugar content (e.g., glucose, fructose, sucrose, and maltose) increased in black garlic compared to fresh and steamed garlic. Furthermore, this increased sugar content of black garlic might be related to its sweet taste (Sasaki et al., 2007). During the manufacturing process pH decreased significantly. White garlic pH was the highest one with a value of 5.94, whereas black garlic pH decreased rapidly under 3.69 reaching 3.49 value in the 45 days of aging process. This result is in agreement with the report of Shin et al. 2008, which showed that the pH of black garlic decreased from 6.40 to 5.29 after 6 days of aging. The same observation has recently been described (Bae, Cho, Won, Lee, & Park, 2014; Toledano-Medina, Pérez-Aparicio, Moreno-Rojas, & Merinas-Amo, 2016). A heating temperature over 60 °C and a decrease in pH below 4.2 are two important factors for preventing the possibility of anaerobic bacteria proliferation. Water activity (a_w) decreased in a lesser extent than other parameters because black garlic was manufactured maintaining high relative humidity. According to Kaanane and Labuza (1989) and Labuza and Saltmarch (1981), the rate of the browning reaction is known to reach a maximum at a_w values in the range of 0.5 - 0.7. However, white and black garlic a_w showed significant differences (Table 1). The 90 % RH and time required for producing black garlic in the present study might have created a situation in which the a_w of the heated garlic sample reached a state of equilibrium with the RH in the chamber in which the black garlic was produced. This a_w condition is thought to facilitate the browning reaction in heated garlic samples. As Table 1 shows, browning intensity (L) in white and black garlic was significantly different with more than 28 units of difference between them, even though the 1C2 and 2C1 black garlic showed similar luminescence (17.85 and 17.58, respectively). It was observed that at higher temperatures garlic browning intensity happened earlier. Studies have shown that when the temperature increased, the browning product formation also increased; however, the initial induction period decreased (J. Choi, Kim, Yang, Sung, & Hong, 1981; M.-H. Kim & Kim, 1990). Garlic color finally changed to dark brown and black, mainly due to the formation of numerous

compounds resulting from the reaction of non-enzymatic browning or Maillard.

3.2. Total polyphenol content (g/kg in Gallic) and antioxidant capacity (% inhibition)

Total polyphenol (g/kg in Gallic) content and antioxidant capacity (inhibition percentage) are shown in Table 1. During heat-treatment, unstable compounds in raw garlic are transformed into stable soluble compounds with a high antioxidant power (Corzo-Martínez et al., 2007; Imai et al., 1994). Previous studies on black garlic reported that this increase in the antioxidant capacity could be due to the increase in polyphenols and S-allyl-cysteine, the compound derived from alliin (Y. M. Lee et al., 2009). The antioxidant power of polyphenols has been demonstrated (Kang, Park, & Lee, 1996) so it seems logical to state that an increase in polyphenol content in black garlic is responsible for the antioxidant properties in this product.

All studied garlic showed significant differences for the total polyphenol content and the antioxidant capacity among them. Both characteristic increased significantly with the heat-treatment. The highest concentration of polyphenol content was obtained in 2C1 black garlic, although all black garlic increased between 6-fold to 12-fold relating with the heat-treatment (Table 1). Previous black garlic studies carried out at 70, 72, 75 and 78 °C with whole bulbs have described an increase in polyphenol content of about 2 to 3-fold, compared to raw garlic (Jang et al., 2008; Toledano-Medina et al., 2016). Our results on the increase of polyphenol content after heating agree in part with those of Jang et al. (2008) who find an increase of 3-fold content.

To clarify the antioxidant properties of black garlic during aging, we focused on the analysis of total polyphenol content. At the end of the heating process, an increase of antioxidant capacity was observed in garlic. All the black garlic samples showed an increase rank of 5.7-fold and 7.8-fold, with respect to white garlic (Table 1). Several studies described that aged black garlic exerts stronger antioxidant activity than garlic *in vitro* and *in vivo* assays (Kakimoto, Suzuki, &

Nishimoto, 2000; Y. M. Lee et al., 2009). The total polyphenol contents of black garlic were not only significantly higher than those of raw garlic, but also increased significantly at the 13th day of aging. Similar results were obtained by Sasaki et al. (2007) exhibiting an antioxidant potency increased in aged black garlic extracts reaching 25-fold compared with fresh garlic. According to Xu and Chang (2008) heat treatment of the phenolic compounds increased the free fraction of phenolic acids, whereas it decreased the ester, glycoside, and ester-bound fractions, leading to an increase in free phenol forms. Gorinstein et al. (2006) showed that the garlic processing conditions lead to changes in the contents of its bioactive compounds, such as polyphenols, flavonoids, and anthocyanins, and that this is connected to the type and duration of treatment. From the results of total polyphenols and antioxidant capacity it is possible to state that the optimum aging period of black garlic to maximize antioxidant content may be the 13st day of aging.

3.3. Toxicity/Antitoxicity

Toxicity of the four types of garlic studied have been assessed in the *Drosophila in vivo* model. Figure 1A shows the relative percentage of emerging adults after treating larvae with different concentrations of these substances, not showing significant values of toxicity for any compound and tested concentration. Yun et al. (2014) reviewed experimental reports related with the toxicity and safety of garlic extracts not founding either adverse effects in animal or human models. The safety of garlic extracts has been well established by studying acute and subacute toxicity tests (S Nakagawa, Masamoto, Sumiyoshi, & Harada, 1984), chronic toxicity test (Sumiyoshi et al., 1984), general toxicity tests (Kanezawa et al., 1984; Shizutoshi Nakagawa, Masamoto, Sumiyoshi, Kunihiro, & Fuwa, 1980), teratogenicity tests (Assayed, Salem, & Khalaf, 2010), toxicity test conducted by the U.S. Food and Drug Administration, and clinical studies (Steiner, Khan, Holbert, & Lin, 1996).

The antitoxicity assays revealed a differential behaviour of the substances. Figure 1B shows that

hydrogen peroxide is significantly toxic at 0.12 M with an average survival rate of 63.4 % with respect to the water control. 0C1 black garlic is the only preventive substance against H₂O₂ with a positive dose-response effect except in the 2 mg/ml concentration. White, 1C2 and 2C1 black garlic did not show significant protective effects against the oxidative toxicant with respect to their concurrent positive control H₂O₂. Lei et al. 2014 studied the effects that black 10-15 days-aged extract garlic had in *Drosophila melanogaster*. The results from this study demonstrated black garlic extracts possessed strong antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*.

3.4. Genotoxicity/Antigenotoxicity

To assess the genotoxicity/antigenotoxicity of the studied compounds we used the SMART Test in *Drosophila melanogaster* (Graf et al., 1998). Increasing concentrations of tested compounds, a negative control which corresponds to water used as a solvent, and a positive control (H₂O₂) for periodically validation of the assay were analysed concurrently. Furthermore, antigenotoxicity experiments were carried out using combined treatments consisting of repeating every concentration tested and by adding the same concentration of hydrogen peroxide, which we have demonstrated that is a potent mutagen in the SMART system (Fernandez-Bedmar et al., 2011).

Negative control showed a frequency of mutations per wing of 0.195 (Table 2) which fall into the historical range for the wing spot test (Merinas-Amo et al., 2013; Rojas-Molina, Campos-Sanchez, Analla, Munoz-Serrano, & Alonso-Moraga, 2005). The final concentration of H₂O₂ used (0.12 M) has been demonstrated to exert a potent genotoxic effect capable to induce somatic mutations and mitotic recombination in *D. melanogaster* (Romero-Jimenez, Campos-Sanchez, Analla, Munoz-Serrano, & Alonso-Moraga, 2005). The average frequency of total mutations per wing obtained in the treatment with H₂O₂ was 0.425 (Table 2). The Table 2 shows the results of genotoxicity assays in the SMART test for white and the three black garlic studied. For each concentration and compound single small, single large, twin and total clones were analysed in the wings of chronically treated

animals. The results showed that all white and black garlic showed a non genotoxic activity, except the white one which increased significantly the frequency of mutations in 0.425 at the highest concentration tested. Similar results were obtained by Suresh K Abraham and Kesavan (1984) and Shukla and Taneja (2002), which demonstrated that aqueous garlic extracts (5% v/v) and fine garlic powder (7.5, 5 and 2.5 g/Kg body weight) supplementation did not induced chromosomal aberrations nor DNA damage in mouse bone marrow cells. Same results were obtained by Sowjanya, Devi, and Madhavi (2009) at 3, 6 and 12 mg/culture in human lymphocytes and by Chughtai, Dhmad, Khalid, and Mohamed (1998) (extracts of fresh garlic bulbs) in yeast.

Vegetables contain many polyphenols and oligoelements with antimutagenic activity (Fernandez-Bedmar et al., 2011). Table 2 shows that 0C1 black garlic was the only able to inhibit the genotoxic activity of hydrogen peroxide in a dose dependent manner. The highest concentration tested for 0C1 black garlic in the combined treatments reached to eliminate part of the genotoxic effect of H₂O₂, showing a decreasing of the total mutation frequency in 0.266 spots/wing and inhibiting around 37 % of genotoxicity (see Figure 2) induced by H₂O₂ (without control correction). The rest of compound tested did not show significant protective results against the DNA damage at the highest concentration and a slight inhibition percentage of mutations induced by the genotoxine was observed (24 % for white, 18.6 % for 1C2 black and 7.5 % for 2C1 black garlic).

In general, garlic has significant antioxidant activity and protective effects against oxidative DNA damage regardless of processing method (Park, Park, & Park, 2009). Our antitoxicity and antigenotoxicity results showed that 0C1 black garlic (13 days aged) is able to protect genomic damages against this genotoxin in a doses-dependent manner. This effect could probably be due to the antioxidative and free-radicals scavenging capacity of their respective organosulfur compounds, which agree with previous reports (Benkeblia, 2005; Imai et al., 1994; Prakash, Singh, & Upadhyay, 2007). Besides the antioxidant activity, our results about the strongest antioxidant activity that black

garlic showed compared with fresh garlic are in agreement with *in vivo* and *in vitro* garlic assays of Bingqiao et al. (2008) and S. H. Kim et al. (2012).

3.5. Longevity assays

The entire lifespan curves obtained by the Kaplan-Meier method for each substance and concentration are shown in Figure 3. *Drosophila* had a lifespan expansion of 60 days for the control treatment. White and 1C2 black garlic increased significantly the *Drosophila's* lifespan at the lowest and the two moderated concentrations tested (0.25, 1 and 2 mg/ml) with an expansion of 10.1, 11.1 and 18.5 days for white garlic and 9.4, 10.1 and 9.8 days for black garlic, respectively, with respect to the concurrent control (Table 3). Furthermore, all concentrations assayed of 0C1 black garlic, except the highest one, induced a lifespan expansion in *D. melanogaster* compared to the control in a value over 10 days in each one with respect to the control. On the other hand, 2C1 black garlic did not have activity on the lifespan of *Drosophila melanogaster* at any tested concentration. No previous *in vivo* studies on longevity properties of black garlic as a food have been reported. However, several authors have reported beneficial effects on animal lifespan using garlic extracts in: *D. melanogaster* at 37.5 and 75 mg/ml (Lei, Xu, Zhang, Zhang, & Gao, 2014); *C. elegans* at 50 ppm (Huang et al., 2015) and senescence accelerated mice (SAMP8) at 2 % w/w (Momoucm & TAKASHINA, 1994). We suggest that our differences with these results could be due to the different type of sample presentation. We have used entire garlic material and all data available elsewhere on lifespan trials come from extracts but not crude material. In this sense, Prowse, Galloway, and Foggo (2006), demonstrated that garlic juice had insecticidal activity across life stages of flies at a wide range of concentrations (0.25-5 %) in two dipteran pests (*Delia radicum* and *Musca domestica*). Lei et al. (2014) studied the effects of black 10-15 days-aged garlic extracts on lifespan in *Drosophila* through observation on half dead time, mean and maximum lifespan of organisms. The results suggested a significant longevity extension in *Drosophila* treated with black

garlic extracts in a dose-dependent manner.

3.6. Healthspan assays

In order to know the quality of life of the *Drosophila* treated in the longevity assays, we studied the 25 % of individual survival at the top of the lifespan curves obtained in the previous test for each substance and concentration tested. This part of the lifespan is considered as the healthspan of a curve, characterized by low and more or less constant age-specific mortality rate values (Soh, Hotic, & Arking, 2007). The results are shown in Figure 4.

Only white and 0C1 black garlic induced a significant increase of healthspan in *Drosophila melanogaster* compared to the control in an average of 8 and 11.5 days, respectively. On the contrary, 1C2 and 2C1 black garlic induced a significant reduction of healthspan in *Drosophila* at moderate concentration with a value of 7.3 and 9 days, respectively with respect to the control (Table 3). No previous studies about the properties that white and black garlic have on the quality of life have been reported.

3.7. Cytotoxicity

All the substances assayed showed cytotoxic activity against HL-60 tumoral cells (Figure 5). White and black garlic showed a dose dependent response, with an increase of the cytotoxicity level according to increased concentration of garlic. White garlic showed the main cytotoxicity effect against the tumoral cell being the inhibitory concentration 50 (IC₅₀) under 0.03 mg/ml.

Cytotoxicity curve of 0C1 black garlic showed an increase of dose-dependent with a IC₅₀ value of 1 mg/ml. In relation to 1C2 and 2C1 black garlic, no inhibition was observed at the lowest concentration tested, but contrarily strong tendency to increase the cell growth is observed with a IC₅₀ value of 0.7 and 0.9 mg/ml, respectively. Moreover, a completely cells growth inhibition was observed in 1C2 and 2C1 black garlic at 2 mg/ml.

A number of studies have demonstrated the chemopreventive activity of garlic by using different garlic preparations including fresh garlic extract, aged garlic, garlic oil and a number of organosulfur compounds derived from garlic (Islam, Kusumoto, & Al-Mamun, 2011; Lau, Tadi, & Tosk, 1990; PAKA, 2003). The chemopreventive activity has been attributed to the presence of organosulfur compounds in garlic. Therefore, the consumption of garlic may provide some kind of protection against tumor cells proliferation (Seki, Tsuji, Hayato, Moritomo, & Ariga, 2000; Shukla & Kalra, 2007). Studies on the preventive effects of black garlic extracts also shown an induction of inhibition in *in vitro* and *in vivo* gastric cancer cell growth (X. Wang et al., 2012), chemopreventive effects in rats colon tumor (Katsuki et al., 2006) and increase the anti-tumor activity in mouse model treated (Sasaki et al., 2007).

3.8. DNA internucleosomal fragmentation

Figure 6 shows the electrophoresis of the genomic DNA of HL-60 cells treated with different concentrations of white, 0C1, 1C2 and 2C1 black garlic. DNA internucleosomal fragmentation is represented by a DNA laddering and it is associated to the activation of the apoptotic way in cancer cells being a hallmark of the genomic integrity (Wyllie, Kerr, & Currie, 1980). None assayed concentration (4 mg/ml to 0.25 mg/ml) induced internucleosomal fragmentation in the different black garlic treatments, but a slight fragmentation is observed in the lowest assayed concentration of white garlic (0.25 mg/ml). Hence, the cytotoxic activity observed is only induced in a proapoptotic way in the white garlic.

Our results show that only white garlic have a strong cytotoxic effect and induce slight DNA proapoptotic internucleosomal fragmentation against HL-60 cells. This results agree with several reports demonstrating that garlic exerted a chemopreventive effect by increasing apoptosis in lung cancer cells (NCI-H1299) (*Y.-S. Hong, Ham, Choi, & Kim, 2000*). On the other hand, our results do not agree with the results obtained by X. Wang et al. (2012), who detected a dose-dependent

apoptosis in aged black garlic extract in *in vitro* studies.

4. Conclusions

It is the first time that a relationship between the physico-chemical characterisation and the biological activities of white and black garlic is carried out. Systematic, integrate and multifocal studies assessing the toxicity, antigenotoxicity, genotoxicity, antigenotoxicity, longevity, cytotoxicity and pro-apoptotic properties of the different types of garlic were followed in order to propose black garlic as a nutraceutical food. Mention should be made that we have used entire garlic material in all the *in vivo* and *in vitro* assays tested meanwhile most of available data in literature come from extracts but not crude material.

Analysing the physico-chemical properties of the different studied garlic in this research, we must point out the improved qualities that the 13 days aged black garlic reaches with respect to the other processed black garlic and also the white one. The 0C1 black garlic (13 days aged) showed similar weight and °Brix as the raw garlic. Moreover, that black garlic improved the polyphenol content and the inhibition percentage with respect to the white garlic and also with the other types of black garlic if we take into account the time of processing.

All types of garlic were safe without showing toxicity and 0C1 (13 days aged) black garlic showed a slight protection against the oxidative toxicant. With respect to the genotoxic potential, all raw and processed garlic were not genotoxic with the exception of the higher concentration of white garlic. exhibit antigenotoxic effects when the imaginal discs are treated with the genotoxine hydrogen peroxide. The longevity assays in *Drosophila* yielded significant extension of lifespan results in some of the tested concentrations of white and 0C1 and 1C2 black garlic. Finally, the results achieved in the *in vitro* experiments for garlic cytotoxicity were hopeful. All studied garlic induced a decrease in leukaemia cells growth. However, none type of garlic was able to induce proapoptotic internucleosomal DNA fragmentation.

The present study of black garlic might be useful for understanding not only the antioxidant properties of this processed garlic, but also its optimum aging conditions for maximizing biological and antioxidant properties. Important information is added to the agri-food industry on the fermentation conditions data that improve the quality of garlic. Our data suggest that short-aged fermented black garlic has better properties than the longer-fermented ones and even more than white garlic. This latter could have industrial and economics consequences. Taking both the physicochemical and biological data, the 13 days aging black garlic has shown itself to be best nutraceutical. Our findings are relevant for the black garlic processing agrifood companies as the economical and timing incomes are significantly reduced to 13 days aging. The sector should know that black garlic obtained with less cost is healthier than the ones needing more time and processing costs.

5. References

1. Abraham, S. K. (1994). Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. *Mutagenesis*, *9*(4), 383-386.
2. Abraham, S. K., & Kesavan, P. (1984). Genotoxicity of garlic, turmeric and asafoetida in mice. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, *136*(1), 85-88.
3. Agarwal, K. C. (1996). Therapeutic actions of garlic constituents. *Med Res Rev*, *16*(1), 111-124. doi: 10.1002/(SICI)1098-1128(199601)16:1<111::AID-MED4>3.0.CO;2-5
4. Amagase, H. (2006). Clarifying the real bioactive constituents of garlic. *J Nutr*, *136*(3 Suppl), 716S-725S.
5. Amagase, H., Petesch, B. L., Matsuura, H., Kasuga, S., & Itakura, Y. (2001). Intake of garlic and its bioactive components. *J Nutr*, *131*(3s), 955S-962S.
6. Anazetti, M. C., Melo, P. S., Durán, N., & Haun, M. (2003). Comparative cytotoxicity of

- dimethylamide-crotonin in the promyelocytic leukemia cell line (HL60) and human peripheral blood mononuclear cells. *Toxicology*, 188(2–3), 261-274. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X\(03\)00089-1](http://dx.doi.org/10.1016/S0300-483X(03)00089-1)
7. Assayed, M., Salem, H., & Khalaf, A. (2010). Protective effects of garlic extract and vitamin C against cypermethrin reproductive toxicity in male rats. *Research Journal of Veterinary Sciences*, 3(1), 13-27.
 8. Bae, S. E., Cho, S. Y., Won, Y. D., Lee, S. H., & Park, H. J. (2012). A comparative study of the different analytical methods for analysis of S-allyl cysteine in black garlic by HPLC. *LWT - Food Science and Technology*, 46(2), 532-535. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2011.11.013>
 9. 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(1), 397-402.
 10. Benkeblia, N. (2005). Free-radical scavenging capacity and antioxidant properties of some selected onions (*Allium cepa* L.) and garlic (*Allium sativum* L.) extracts. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 48(5), 753-759.
 11. Bingqiao, Z., Haige, W., & Yuanyuan, L. (2008). The antioxidation of black garlic. *Food Research and Development*, 29(10), 56-61.
 12. Block, E. (1985). The chemistry of garlic and onions. *Sci Am*, 252(3), 114-119.
 13. Blumethal, M., Busse, W., & Goldberg, A. (1998). The complete German Commission E monographs. *American Botanical Council, Austin and Integrative Medicine Communications, Boston*.

14. Breitman, T. R. (1990). Growth and differentiation of human myeloid leukemia cell line HL60 *Methods in Enzymology* (Vol. Volume 190, pp. 118-130): Academic Press.
15. Brodnitz, M. H., & Pascale, J. V. (1971). Thiopropanal S-oxide: a lachrymatory factor in onions. *J Agric Food Chem*, *19*(2), 269-272.
16. Capuano, E., & Fogliano, V. (2011). Acrylamide and 5-hydroxymethylfurfural (HMF): A review on metabolism, toxicity, occurrence in food and mitigation strategies. *LWT - Food Science and Technology*, *44*(4), 793-810. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.11.002>
17. Cerella, C., Dicato, M., Jacob, C., & Diederich, M. (2011). Chemical properties and mechanisms determining the anti-cancer action of garlic-derived organic sulfur compounds. *Anticancer Agents Med Chem*, *11*(3), 267-271.
18. Corzo-Martínez, M., Corzo, N., & Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science & Technology*, *18*(12), 609-625. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2007.07.011>
19. Choi, D.-J., Lee, S.-J., Kang, M.-J., Cho, H.-S., Sung, N.-J., & Shin, J.-H. (2008). Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, *37*(4), 465-471.
20. Choi, J., Kim, W., Yang, J., Sung, H., & Hong, S. (1981). Quality changes in red ginseng extract during high temperature storage. *Han'guk Nonghwa Hakhoe chi= Journal of the Korean Agricultural Chemical Society*.
21. Chowdhury, R., Dutta, A., Chaudhuri, S. R., Sharma, N., Giri, A. K., & Chaudhuri, K. (2008). In vitro and in vivo reduction of sodium arsenite induced toxicity by aqueous garlic extract. *Food and Chemical Toxicology*, *46*(2), 740-751. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.108>

22. Chughtai, S. R., Dhmad, M., Khalid, N., & Mohamed, A. (1998). Genotoxicity testing of some spices in diploid yeast. *Pakistan J. Bot*, 30, 33-38.
23. Druesne, N., Pagniez, A., Mayeur, C., Thomas, M., Cherbuy, C., Duée, P.-H., Chaumontet, C. (2004). Diallyl disulfide (DADS) increases histone acetylation and p21waf1/cip1 expression in human colon tumor cell lines. *carcinogenesis*, 25(7), 1227-1236.
24. Feng-chao, L. (2012). 1, HAO Guo 1, ZHU Li 2, YANG Ying 1,*, ZHANG You-lin 1 (1. College of Food Engineering and Nutritional Science, Shannxi Normal University, Xi'an 710062, China; 2. School of Chemical Science and Technology, Yunnan University, Kunming 650091, China); Research progress in the nutritional value and health effects of black garlic [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 13.
25. Fernandez-Bedmar, Z., Anter, J., de La Cruz-Ares, S., Munoz-Serrano, A., Alonso-Moraga, A., & Perez-Guisado, J. (2011). Role of citrus juices and distinctive components in the modulation of degenerative processes: genotoxicity, antigenotoxicity, cytotoxicity, and longevity in *Drosophila*. *J Toxicol Environ Health A*, 74(15-16), 1052-1066. doi: 10.1080/15287394.2011.582306
26. Fleming, J. E., Reveillaud, I., & Niedzwiecki, A. (1992). Role of oxidative stress in *Drosophila* aging. *Mutat Res*, 275(3-6), 267-279.
27. Frei, H., & Wurgler, F. E. (1988). Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result. *Mutat Res*, 203(4), 297-308.
28. Frei, H., & Wurgler, F. E. (1995). Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*. *Mutat Res*, 334(2), 247-258.

29. Gallagher, R., Collins, S., Trujillo, J., McCredie, K., Ahearn, M., Tsai, S., Gallo, R. (1979). Characterization of the continuous, differentiating myeloid cell line (HL-60) from a patient with acute promyelocytic leukemia. *Blood*, 54(3), 713-733.
30. Gorinstein, S., Leontowicz, M., Leontowicz, H., Najman, K., Namiesnik, J., Park, Y.-S., Trakhtenberg, S. (2006). Supplementation of garlic lowers lipids and increases antioxidant capacity in plasma of rats. *Nutrition Research*, 26(7), 362-368. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.nutres.2006.06.008>
31. Graf, U., Abraham, S. K., Guzman-Rincon, J., & Wurgler, F. E. (1998). Antigenotoxicity studies in *Drosophila melanogaster*. *Mutat Res*, 402(1-2), 203-209.
32. Graf, U., Wurgler, F. E., Katz, A. J., Frei, H., Juon, H., Hall, C. B., & Kale, P. G. (1984). Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. *Environ Mutagen*, 6(2), 153-188.
33. Hong, W. K., & Sporn, M. B. (1997). Recent advances in chemoprevention of cancer. *Science*, 278(5340), 1073-1077.
34. Hong, Y.-S., Ham, Y.-A., Choi, J.-H., & Kim, J. (2000). Effects of allyl sulfur compounds and garlic extract on the expressions of Bcl-2, Bax, and p53 in non small cell lung cancer cell lines. *Experimental and Molecular Medicine*, 32(3), 127-134.
35. Huang, C.-H., Hsu, F.-Y., Wu, Y.-H., Zhong, L., Tseng, M.-Y., Kuo, C.-J., Chiou, S.-H. (2015). Analysis of lifespan-promoting effect of garlic extract by an integrated metabolo-proteomics approach. *The Journal of nutritional biochemistry*, 26(8), 808-817.
36. Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H., & Itakura, Y. (1994). Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med*, 60(5), 417-420. doi: 10.1055/s-2006-959522

37. Islam, M., Kusumoto, Y., & Al-Mamun, M. A. (2011). Cytotoxicity and cancer (HeLa) cell killing efficacy of aqueous garlic (*Allium sativum*) extract. *Journal of Scientific Research*, 3(2), 375-382.
38. Jang, E. K., Seo, J. H., & Lee, S. P. (2008). Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 40(4), 443-448.
39. Jones, M., Collin, H., Tregova, A., Trueman, L., Brown, L., Cosstick, R., Tomsett, A. (2007). The biochemical and physiological genesis of alliin in garlic. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 1(1), 21-24.
40. Kaanane, A., & Labuza, T. (1989). The Maillard Reaction in Foods. In "The Maillard Reaction in Aging, Diabetes and Nutrition". J. Baynes: AR Liss Press, Inc. New York.
41. Kakimoto, M., Suzuki, A., & Nishimoto, I. (2000). Additives, Supplements, Antioxidants and Phyto-chemicals. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 266-267.
42. Kanezawa, A., Nakagawa, S., Sumiyoshi, H., Masamoto, K., Harada, H., Nakagami, S., Fuwa, T. (1984). General toxicity tests of garlic extract preparation (Kyoleopin) containing vitamins. *Oyo yakuri*, 27, 909-929.
43. Kang, Y.-H., Park, Y.-K., & Lee, G.-D. (1996). The nitrite scavenging and electron donating ability of phenolic compounds. *Korean Journal of Food Science and Technology*, 28(2), 232-239.
44. Katsuki, T., Hirata, K., Ishikawa, H., Matsuura, N., Sumi, S.-i., & Itoh, H. (2006). Aged garlic extract has chemopreventative effects on 1, 2-dimethylhydrazine-induced colon tumors in rats. *The Journal of nutrition*, 136(3), 847S-851S.

45. Kim, I., Kim, J.-Y., Hwang, Y.-J., Hwang, K.-A., Om, A.-S., Kim, J.-H., & Cho, K.-J. (2011). The beneficial effects of aged black garlic extract on obesity and hyperlipidemia in rats fed a high-fat diet. *J. Med. Plants Res*, 5, 3159-3168.
46. Kim, M.-H., & Kim, B.-Y. (1990). Development of optimum processing conditions in air dried garlics using response surface methodology. *J Korean Soc Food Nutr*, 19, 234-238.
47. Kim, M. H., Kim, M. J., Lee, J. H., Han, J. I., Kim, J. H., Sok, D. E., & Kim, M. R. (2011). Hepatoprotective effect of aged black garlic on chronic alcohol-induced liver injury in rats. *J Med Food*, 14(7-8), 732-738. doi: 10.1089/jmf.2010.1454
48. Kim, S. H., Jung, E. Y., Kang, D. H., Chang, U. J., Hong, Y.-H., & Suh, H. J. (2012). Physical stability, antioxidative properties, and photoprotective effects of a functionalized formulation containing black garlic extract. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 117, 104-110. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2012.08.013>
49. Kwon, K.-B., Yoo, S.-J., Ryu, D.-G., Yang, J.-Y., Rho, H.-W., Kim, J.-S., Park, B.-H. (2002). Induction of apoptosis by diallyl disulfide through activation of caspase-3 in human leukemia HL-60 cells. *Biochemical pharmacology*, 63(1), 41-47.
50. Labuza, T., & Saltmarch, M. (1981). The nonenzymatic browning reaction as affected by water in foods. *Water activity: influences on food quality*, 605-650.
51. Lau, B. H., Tadi, P. P., & Tosk, J. M. (1990). *Allium sativum* (garlic) and cancer prevention. *Nutrition Research*, 10(8), 937-948.
52. Lee, E. N., Choi, Y. W., Kim, H. K., Park, J. K., Kim, H. J., Kim, M. J., Yoon, S. (2011). Chloroform extract of aged black garlic attenuates TNF-alpha-induced ROS generation, VCAM-1 expression, NF-kappaB activation and adhesiveness for monocytes in human umbilical vein endothelial cells. *Phytother Res*, 25(1), 92-100. doi: 10.1002/ptr.3230

53. Lee, Y. M., Gweon, O. C., Seo, Y. J., Im, J., Kang, M. J., Kim, M. J., & Kim, J. I. (2009). Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutr Res Pract*, 3(2), 156-161. doi: 10.4162/nrp.2009.3.2.156
54. Lei, M.-M., Xu, M.-Y., Zhang, Z.-S., Zhang, M., & Gao, Y.-F. (2014). The analysis of saccharide in black garlic and its antioxidant activity. *Advance Journal of Food Science and Technology*, 6(6), 755-760.
55. Li, L., Edgar, B. A., & Grewal, S. S. (2010). Nutritional control of gene expression in *Drosophila* larvae via TOR, Myc and a novel cis-regulatory element. *BMC Cell Biol*, 11, 7. doi: 10.1186/1471-2121-11-7
56. Lindsley, D. L., & Zimm, G. G. (2012). *The genome of Drosophila melanogaster*: Academic Press.
57. Merinas-Amo, M. T., Villalba-Benito, L., Almagro-Berlanga, R., Romero-Jimenez, M., Mateo-Fernandez, M., Alonso-Moraga, A., & Calahorra-Nuñez, F. (2013). Toxicological, genotoxicological, antigenotoxicological, cytotoxicity and lifespan studies of beer and some components. *Toxicology Letters*(221), S124.
58. Momoucm, T., & TAKASHINA, P.-J. C. (1994). Prolongation of Life Span and Improved Learning in the Senescence Accelerated Mouse Produced by Aged Garlic Extract. *Biol. Pharm. Bull*, 7(12), 1589-1594.
59. Moraga, A. A., & Graf, U. (1989). Genotoxicity testing of antiparasitic nitrofurans in the *Drosophila* wing somatic mutation and recombination test. *Mutagenesis*, 4(2), 105-110.
60. Nagata, S. (2000). Apoptotic DNA fragmentation. *Exp Cell Res*, 256(1), 12-18. doi: 10.1006/excr.2000.4834

61. Nakagawa, S., Masamoto, K., Sumiyoshi, H., & Harada, H. (1984). [Acute toxicity test of garlic extract]. *The Journal of toxicological sciences*, 9(1), 57-60.
62. Nakagawa, S., Masamoto, K., Sumiyoshi, H., Kunihiro, K., & Fuwa, T. (1980). [Effect of raw and extracted-aged garlic juice on growth of young rats and their organs after peroral administration (author's transl)]. *The Journal of toxicological sciences*, 5(1), 91-112.
63. PAKA, B. II. (2003). Extract of garlic (*Allium sativum*) in cancer chemoprevention. *Experimental oncology*, 25, 93-97.
64. Park, J.-H., Park, Y. K., & Park, E. (2009). Antioxidative and antigenotoxic effects of garlic (*Allium sativum* L.) prepared by different processing methods. *Plant foods for human nutrition*, 64(4), 244-249.
65. Prakash, D., Singh, B. N., & Upadhyay, G. (2007). Antioxidant and free radical scavenging activities of phenols from onion (*Allium cepa*). *Food Chemistry*, 102(4), 1389-1393.
66. Prowse, G. M., Galloway, T. S., & Foggo, A. (2006). Insecticidal activity of garlic juice in two dipteran pests. *Agricultural and Forest Entomology*, 8(1), 1-6.
67. Purev, U., Chung, M. J., & Oh, D. H. (2012). Individual differences on immunostimulatory activity of raw and black garlic extract in human primary immune cells. *Immunopharmacol Immunotoxicol*, 34(4), 651-660. doi: 10.3109/08923973.2011.649288
68. Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26(9-10), 1231-1237. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849\(98\)00315-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0891-5849(98)00315-3)
69. Ren, N., Charlton, J., & Adler, P. N. (2007). The flare gene, which encodes the AIP1 protein

- of *Drosophila*, functions to regulate F-actin disassembly in pupal epidermal cells. *Genetics*, 176(4), 2223-2234. doi: 10.1534/genetics.107.072959
70. Rivlin, R. S. (2006). Is garlic alternative medicine? *J Nutr*, 136(3 Suppl), 713S-715S.
71. Rojas-Molina, M., Campos-Sanchez, J., Analla, M., Munoz-Serrano, A., & Alonso-Moraga, A. (2005). Genotoxicity of vegetable cooking oils in the *Drosophila* wing spot test. *Environ Mol Mutagen*, 45(1), 90-95. doi: 10.1002/em.20078
72. Romero-Jimenez, M., Campos-Sanchez, J., Analla, M., Munoz-Serrano, A., & Alonso-Moraga, A. (2005). Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. *Mutat Res*, 585(1-2), 147-155. doi: 10.1016/j.mrgentox.2005.05.004
73. Sasaki, J.-i., Lu, C., Machiya, E., Tanahashi, M., & Hamada, K. (2007). Processed black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance anti-tumor potency against mouse tumors. *Energy (kcal/100 g)*, 227, 138.
74. Sato, E., Kohno, M., Hamano, H., & Niwano, Y. (2006). Increased anti-oxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation. *Plant Foods Hum Nutr*, 61(4), 157-160. doi: 10.1007/s11130-006-0017-5
75. Seki, T., Tsuji, K., Hayato, Y., Moritomo, T., & Ariga, T. (2000). Garlic and onion oils inhibit proliferation and induce differentiation of HL-60 cells. *Cancer letters*, 160(1), 29-35.
76. Seo, Y. J., Gweon, O. C., Im, J., Lee, Y. M., Kang, M. J., & Kim, J. I. (2009). Effect of garlic and aged black garlic on hyperglycemia and dyslipidemia in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Food Science and Nutrition*, 14(1), 1-7. doi: 10.3746/jfn.2009.14.1.001
77. Shinkawa, H., Takemura, S., Minamiyama, Y., Kodai, S., Tsukioka, T., Osada-Oka, M., . . . Suehiro, S. (2009). S-allylcysteine is effective as a chemopreventive agent against porcine

- serum-induced hepatic fibrosis in rats. *Osaka City Med J*, 55(2), 61-69.
78. Shukla, Y., & Kalra, N. (2007). Cancer chemoprevention with garlic and its constituents. *Cancer letters*, 247(2), 167-181.
79. Shukla, Y., & Taneja, P. (2002). Antimutagenic effects of garlic extract on chromosomal aberrations. *Cancer letters*, 176(1), 31-36.
80. Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventós, R. M. (1999). [14] Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of folin-ciocalteu reagent *Methods in Enzymology* (Vol. Volume 299, pp. 152-178): Academic Press.
81. Soh, J. W., Hotic, S., & Arking, R. (2007). Dietary restriction in *Drosophila* is dependent on mitochondrial efficiency and constrained by pre-existing extended longevity. *Mechanisms of ageing and development*, 128(11), 581-593.
82. Sowjanya, B. L., Devi, K. R., & Madhavi, D. (2009). Modulatory effects of garlic extract against the cyclophosphamide induced genotoxicity in human lymphocytes in vitro. *Journal of Environmental biology*, 30(5), 663.
83. Steiner, M., Khan, A. H., Holbert, D., & Lin, R. (1996). A double-blind crossover study in moderately hypercholesterolemic men that compared the effect of aged garlic extract and placebo administration on blood lipids. *The American journal of clinical nutrition*, 64(6), 866-870.
84. Sumiyoshi, H., Kanezawa, A., Masamoto, K., Harada, H., Nakagami, S., Yokota, A., . . . Nakagawa, S. (1984). [Chronic toxicity test of garlic extract in rats]. *The Journal of toxicological sciences*, 9(1), 61-75.
85. Tasset-Cuevas, I., Fernandez-Bedmar, Z., Lozano-Baena, M. D., Campos-Sanchez, J., de

- Haro-Bailon, A., Munoz-Serrano, A., & Alonso-Moraga, A. (2013). Protective effect of borage seed oil and gamma linolenic acid on DNA: in vivo and in vitro studies. *PLoS One*, 8(2), e56986. doi: 10.1371/journal.pone.0056986
86. Tattelman, E. (2005). Health effects of garlic. *Am Fam Physician*, 72(1), 103-106.
87. Toledano-Medina, M. A., Pérez-Aparicio, J., Moreno-Rojas, R., & Merinas-Amo, T. (2016). Evolution of some physicochemical and antioxidant properties of black garlic whole bulbs and peeled cloves. *Food Chemistry*, 199, 135-139. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.128>
88. Wang, D., Feng, Y., Liu, J., Yan, J., Wang, M., Sasaki, J.-i., & Lu, C. (2010). Black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance the immune system. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 4(1), 37-40.
89. Wang, X., Jiao, F., Wang, Q. W., Wang, J., Yang, K., Hu, R. R., . . . Wang, Y. S. (2012). Aged black garlic extract induces inhibition of gastric cancer cell growth in vitro and in vivo. *Mol Med Rep*, 5(1), 66-72. doi: 10.3892/mmr.2011.588
90. Wu, X.-J., Kassie, F., & Mersch-Sundermann, V. (2005). The role of reactive oxygen species (ROS) production on diallyl disulfide (DADS) induced apoptosis and cell cycle arrest in human A549 lung carcinoma cells. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 579(1), 115-124.
91. Wyllie, A. H., Kerr, J. R., & Currie, A. (1980). Cell death: the significance of apoptosis. *International review of cytology*, 68, 251-306.
92. Xu, B., & Chang, S. K. (2008). Total phenolics, phenolic acids, isoflavones, and anthocyanins and antioxidant properties of yellow and black soybeans as affected by thermal processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56(16), 7165-7175.

93. Yan, J., Huen, D., Morely, T., Johnson, G., Gubb, D., Roote, J., & Adler, P. N. (2008). The multiple-wing-hairs gene encodes a novel GBD-FH3 domain-containing protein that functions both prior to and after wing hair initiation. *Genetics*, *180*(1), 219-228. doi: 10.1534/genetics.108.091314
94. Yun, H.-M., Ban, J. O., Park, K.-R., Lee, C. K., Jeong, H.-S., Han, S. B., & Hong, J. T. (2014). Potential therapeutic effects of functionally active compounds isolated from garlic. *Pharmacology & therapeutics*, *142*(2), 183-195.

Tables and Figures captions

Table 1. Physicochemical characterization of four types of garlic according to the days of aging process. ⁽¹⁾ Different letters mean significantly different values in one-way ANOVA method using the post hoc Tukey test.

Type of garlic	Aging process (days)	Weight of 10 garlic cloves (g)	Soluble solid content (°Brix)	pH	Water activity (a_w)	Browning intensity (L)	Polyphenol content (g/kg in Gallic)	Inhibition percentage (TROLOX mmol/kg sample)
White	0	49.69 c ⁽¹⁾	40.47 a	5.94 d	0.97 c	47.16 c	4.30 a	10.20 a
0C1 Black	13	45.83 bc	40.47 a	3.69 c	0.93 a	18.73 b	10.94 b	67.65 c
1C2 Black	32	37.57 b	43.17 b	3.60 b	0.93 a	17.85 a	14.67 c	57.35 b
2C1 Black	45	19.67 a	45.67 c	3.49 a	0.93 a	17.58 a	16.17 d	78.61 d

Table 2. Genotoxicity and antigenotoxicity of white (0 days aging), 0C1 Black (13 days aging), 1C2 Black (32 days aging) and 2C1 Black (45 days aging) garlic in the *Drosophila* wing spot test. ⁽¹⁾

Statistical diagnosis according to Frei & Wurgler (1988, 1995). +: positive ($p < 0.05$), -: negative.

m: multiplication factor. Levels of significance $\alpha = \beta = 0.05$, tail test without Bonferroni correction.

Inconclusive results were resolved by U-test of Mann Whitney and Wilconxon. ⁽²⁾ The inhibition

percentages for the combined treatments were calculated from total spots per wing according to S.

K. Abraham (1994).

Compound	Clones per wing (n° spots) ⁽¹⁾					Inhibition percentaje (%) ⁽²⁾
	Number of wings	Small single clones (1-2 cells) m = 2	Large simple clones (more than 2 cells) m = 5	Twin clones m = 5	Total clones m = 2	
H ₂ O	41	0.146 (6)	0.049 (2)	0	0.195 (8)	
H ₂ O ₂	40	0.350 (14)	0.075 (3)	0	0.425 (17) +	
SIMPLE TREATMENT						
White garlic (mg/ml)						
0.25	40	0.225 (9)	0.025 (1)	0.025 (1)	0.275 (11) -	
2	40	0.375 (15)	0.050 (2)	0.000	0.425 (17) +	
0C1 Black garlic (mg/ml)						
0.25	40	0.175 (7)	0.025 (1)	0.000	0.200 (8) -	
2	41	0.122 (5)	0.000	0.000	0.122 (5) -	
1C2 Black garlic (mg/ml)						
0.25	40	0.200 (8)	0.025 (1)	0.025 (1)	0.250 (10) -	
2	40	0.175 (7)	0.025 (1)	0.000	0.200 (8) -	
2C1 Black garlic (mg/ml)						
0.25	40	0.175 (7)	0.05 (2)	0.000	0.225 (9) -	
2	40	0.250 (10)	0.000	0.000	0.250 (10) -	
COMBINED TREATMENT WITH H₂O₂ (0.12 M)						
White garlic (mg/ml)						

0.25	34	0.235 (8)	0.088 (3)	0.000	0.323 (11) -	24
2	34	0.265 (10)	0.206 (7)	0.000	0.500 (17) +	-17
0C1 Black garlic (mg/ml)						
0.25	30	0.5 (15)	0.033 (1)	0.000	0.533 (16) +	-25.4
2	30	0.233 (7)	0.033 (1)	0.000	0.266 (8) -	37.4
1C2 Black garlic (mg/ml)						
0.25	26	0.307 (8)	0.038 (1)	0.000	0.346 (9) -	18.6
2	38	0.368 (14)	0.053 (2)	0.000	0.421 (16) -	0.17
2C1 Black garlic (mg/ml)						
0.25	28	0.357 (10)	0.036 (1)	0.000	0.393 (11) -	7.5
2	28	0.357 (10)	0.250 (7)	0.000	0.607 (17) +	-42.8

Table 3. Mean and significances of lifespan and healthspan curves for the different garlic treatments assayed in *Drosophila*. Results were calculated by the Kaplan-Meier method and significance of the curves determined by the Log-Rank method (Mantel-Cox). ⁽¹⁾ ns: non-significant ($p > 0.05$), *: significant ($p < 0.05$), **: significant ($p < 0.01$), ***: significant ($p < 0.001$).

Treatment	Lifespan mean (days)	Healthspan mean (days)
Control	60.309	32.455
White garlic (0 days aging)		
0.25 mg/ml	70.468 *	38.400 ns
0.5 mg/ml	68.718 ns	29.400 ns
1 mg/ml	71.429 **	40.385 *
2 mg/ml	78.888 ***	40.444 *
4 mg/ml	58.214 ns	31.909 ns
0C1 Black garlic (13 days aging)		
0.25 mg/ml	70.146 *	37.667 ns
0.5 mg/ml	71.716 **	38.183 ns
1 mg/ml	70.732 *	30.848 ns
2 mg/ml	71.800 *	43.900 *
4 mg/ml	62.600 ns	33.100 ns
1C2 Black garlic (32 days aging)		
0.25 mg/ml	69.727 *	29.364 ns
0.5 mg/ml	65.191 ns	25.145 *
1 mg/ml	70.490 **	31.096 ns
2 mg/ml	70.179 *	28.565 ns
4 mg/ml	60.255 ns	26.200 ns
2C1 Black garlic (45 days aging)		
0.25 mg/ml	59.058 ns	24.071 ns
0.5 mg/ml	64.754 ns	41.292 ns
1 mg/ml	59.815 ns	28.500 ns
2 mg/ml	57.304 ns	23.460 **
4 mg/ml	66.375 ns	40.500 ns

Figure 1. Toxicity (A) and antitoxicity (B) levels of white (0 days aging), 0C1 black (13 days aging), 1C2 black (32 days aging) and 2C1 black (45 days aging) garlic studied in *Drosophila melanogaster*. A) Percentage of viability of *Drosophila* treated with different concentrations of the assayed garlic. B) Viability of *Drosophila* tested with different concentrations of the tested garlic combined with the genotoxicant hydrogen peroxide at 0.12 M. * : significant ($p > 0.05$), with respect to their concurrent controls.

Figure 1

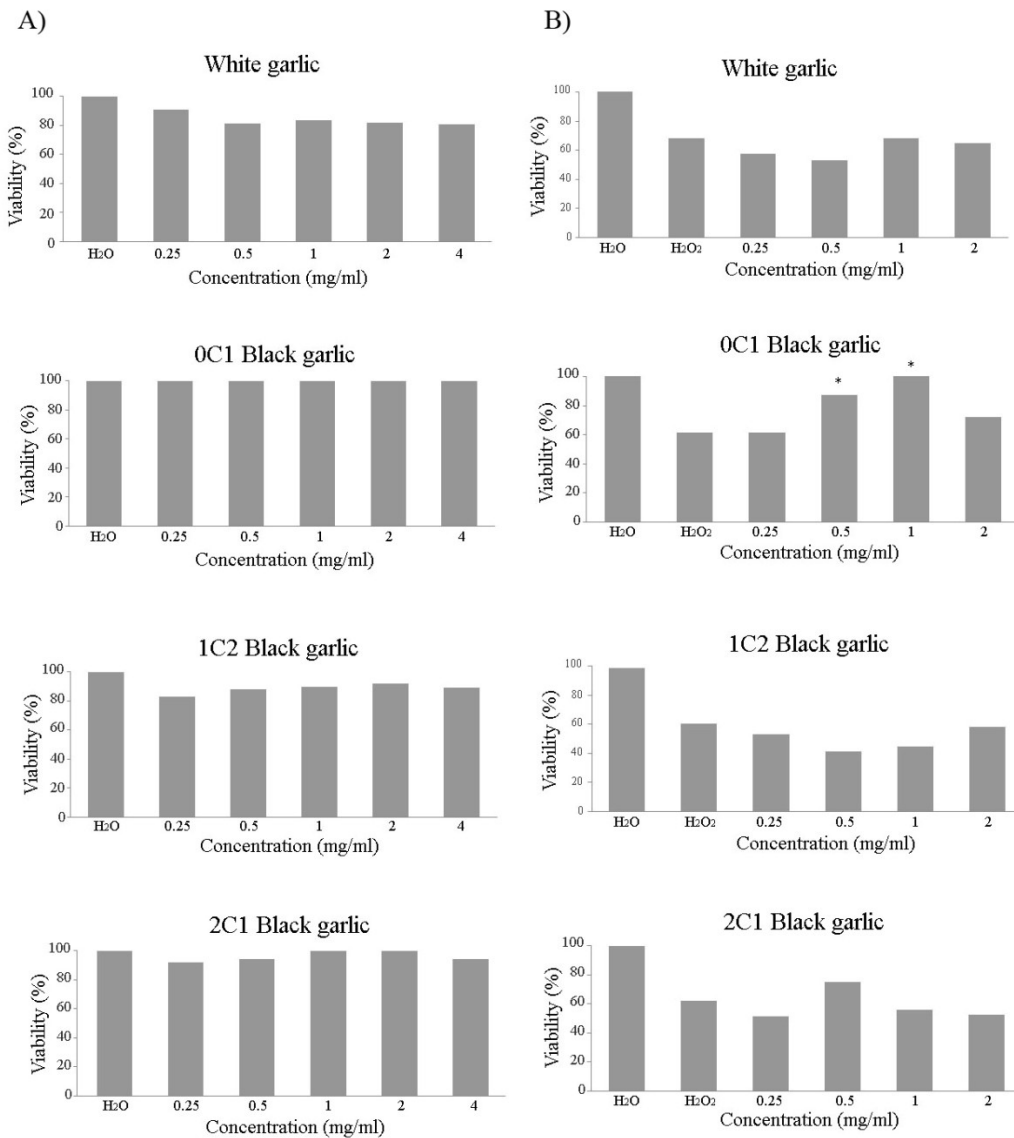


Figure 2. Survival curves of *Drosophila melanogaster* fed with different concentrations of white (0 days aging), 0C1 black (13 days aging), 1C2 black (32 days aging) and 2C1 black (45 days aging) garlic over time.

Figure 2

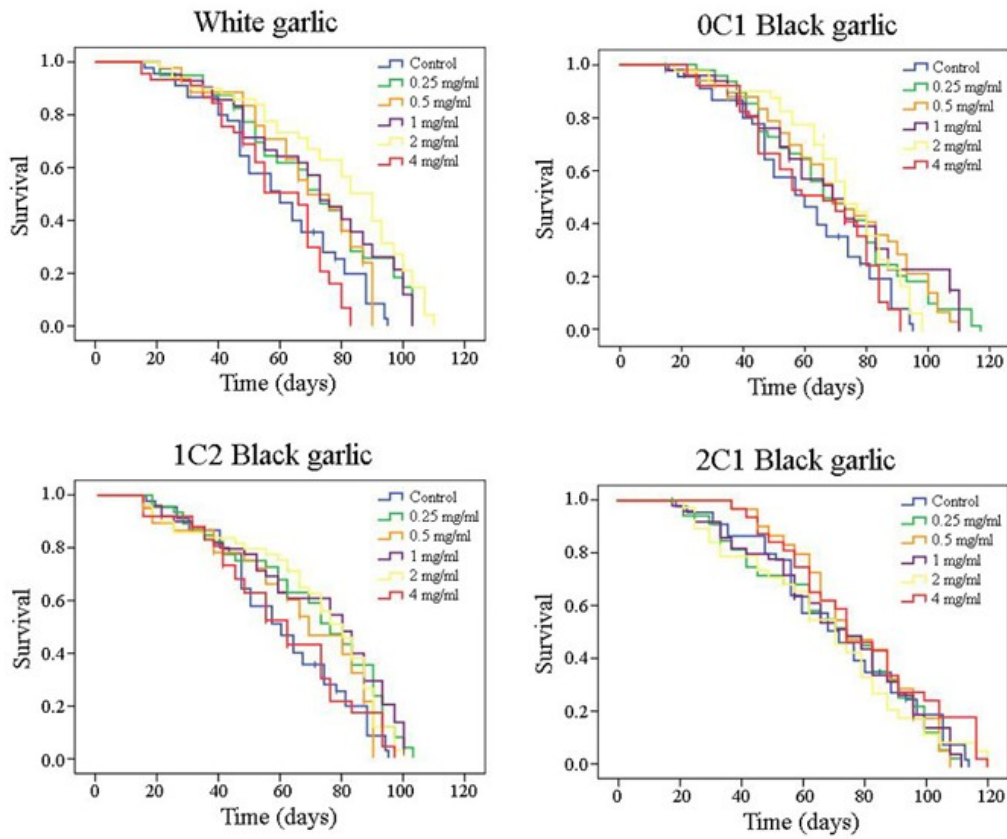


Figure 3. Healthspan effect on *Drosophila melanogaster* fed with different concentrations of white (0 days aging), 0C1 black (13 days aging), 1C2 black (32 days aging) and 2C1 black (45 days aging) garlic. *: significant ($p < 0.05$).

Figure 3

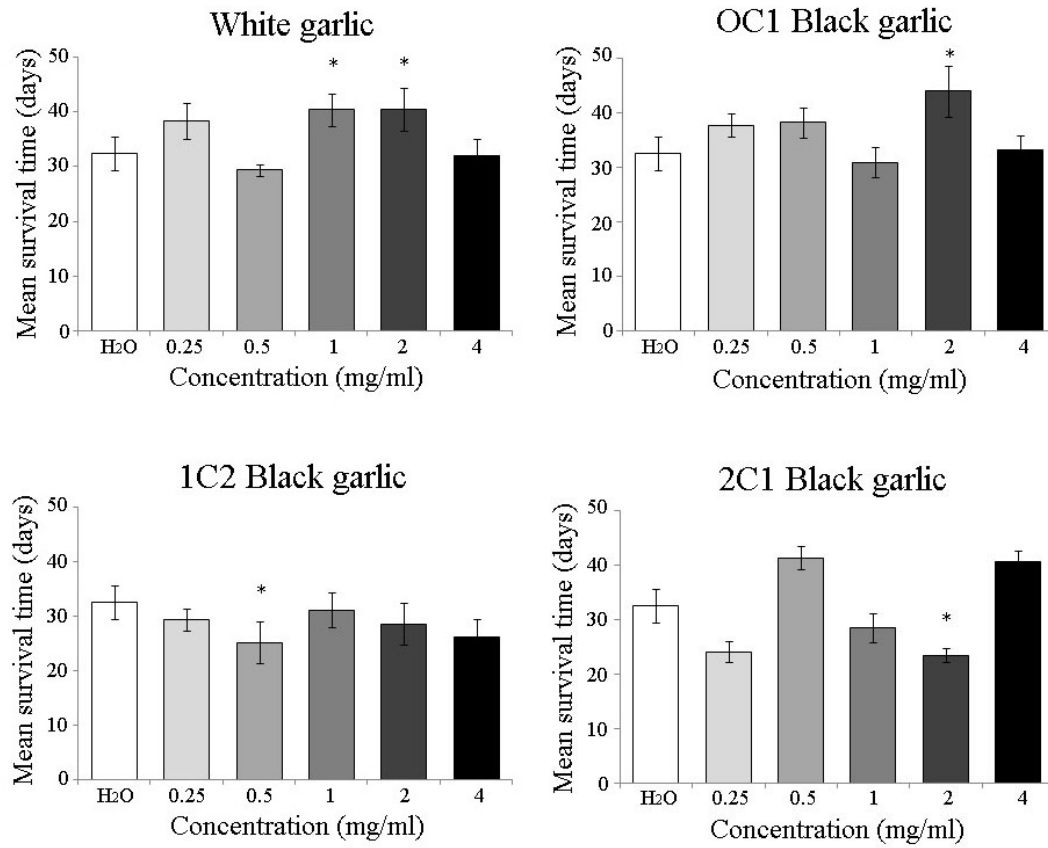


Figure 4. Viability of HL-60 cells treated with different concentrations of white (0 days aging), 0C1 black (13 days aging), 1C2 black (32 days aging) and 2C1 black (45 days aging) garlic for 72 hours.

Figure 4

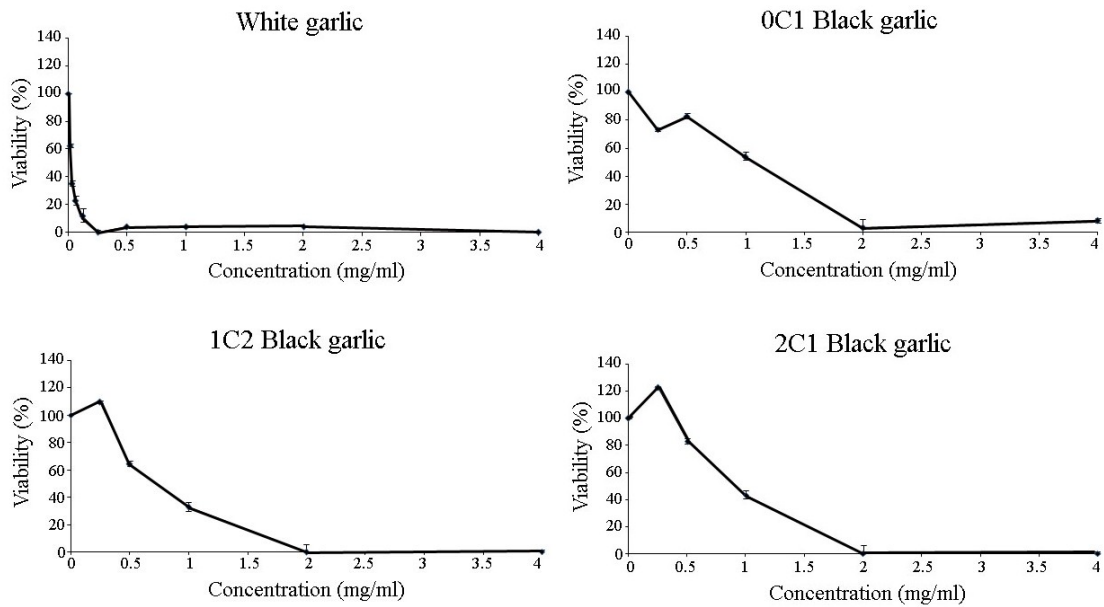
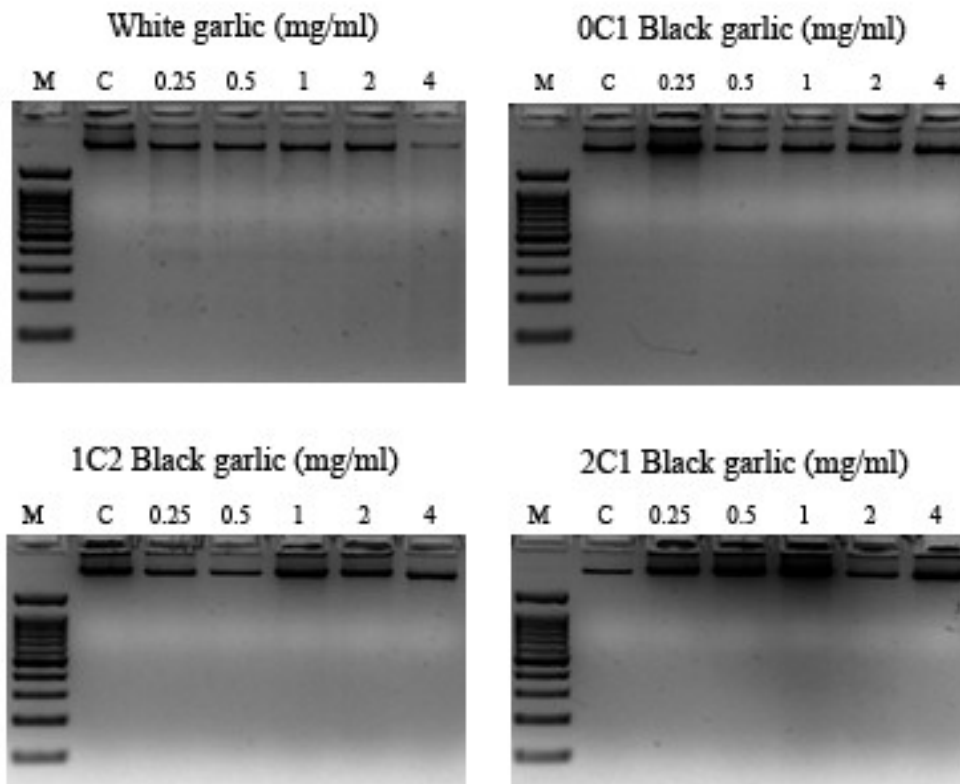


Figure 5. Internucleosomal DNA fragmentation in HL-60 cells treated for 5 hour with different concentrations of white (0 days aging), 0C1 black (13 days aging), 1C2 black (32 days aging) and 2C1 black (45 days aging) garlic. DNA fragmentation was detected following electrophoresis in agarose gels and staining with ethidium bromide. M: indicates DNA size marker; C: indicates control (lane 1); 0.25 mg/ml (lane 2); 0.50 mg/ml (lane 3); 1 mg/ml (lane 4); 2 mg/ml (lane 5) and 4 mg/ml (lane 6) of garlic sample.

Figure 5



CONCLUSIONES GENERALES

En el Artículo 1 se concluye que:

- ✓ El ajo negro tiene una composición fisicoquímica y funcional significativamente diferente a la del ajo fresco.
- ✓ La temperatura del proceso de calentamiento influyen en la rapidez del cambio de las propiedades fisico-químicas de ajo fresco a ajo negro, produciendose los cambios mas rápidamente a mayor temperatura.
- ✓ Las principales diferencias detectadas entre el ajo fresco y el ajo negro son: oscurecimiento o browning (valor L), descenso de pH y a_w , aumento de sólidos solubles y concentración de polifenoles y capacidad antioxidante.
- ✓ La capacidad antioxidante del ajo negro se ve afectada por la temperatura y el tiempo de proceso. Se observan los valores más altos en cuanto a capacidad antioxidante alrededor de los 21-24 días. A partir de este momento empiezan a caer los valores de la capacidad antioxidante.
- ✓ Son necesarios más estudios para optimizar el tiempo y temperatura del proceso y conseguir ajos negros estandarizados con la máxima capacidad antioxidante.
- ✓ La evolución en cuanto a propiedades fisico-químicas de la transformación de ajo fresco en cabezas enteras y en dientes pelados, sigue un modelo muy similar. Las diferencias observadas pudieran ser debidas a la variabilidad de la muestra.
- ✓ Son necesarios más estudios con diferentes tipos de ajo, cabezas enteras o dientes pelados para obtener conclusiones complementarias.

En el segundo Artículo 2 se concluye que:

- ✓ La evolución de las muestras estudiadas sigue el modelo descrito en otras publicaciones anteriores mostrando una tendencia ascendente de la de acidez, ° Brix, azúcares reductores,

polifenoles y capacidad antioxidante y un descenso significativo en el pH del ajo negro.

- ✓ Si se observan las curvas de evolución, se concluye que existen diferencias en la fabricación de ajo negro con diferentes variedades y con ajos de diferente tiempo de almacenamiento, posiblemente debidas a la variabilidad inherente a los datos iniciales de las muestras
- ✓ Al comparar los diferentes gráficos obtenidos se aprecia correlación entre la bajada de pH y una subida de la acidez del producto, así como el incremento de los azúcares y la cantidad de sólidos solubles presentes en las muestras, mostrándose este valor como una mediada indirecta del dulzor del producto.
- ✓ En todos los caso estudiados (diferentes variedades y diferentes tiempos de almacenamiento del ajo) existe un descenso en la capacidad antioxidante de las muestras analizadas. Dependiendo de la variedad el descenso en la capacidad antioxidante del 21 al 34 días es diferente. Se presenta mayor descenso en las muestras de las varieades Morado (2013) y Temprano (2014). En la variedad Blanco Americano el descenso es muy similar en los dos tipos de ajo.
- ✓ Son necesarios más estudios para obtener resultados comparativos de la variedad y del tiempo de almacenamiento del ajo.
- ✓ Al contrastar los valores de la capacidad antioxidante y la cantidad de polifenoles a partir del día 21 de fabricación se aprecia una correlación negativa con los valores de polifenoles obtenidos en todas las muestras analizadas. Este hecho debería ser estudiado con otros ensayos, ya que al aumentar el contenido de polifenoles debería aumentar la capacidad antioxidante global del producto tal y como se refleja en numerosas investigaciones.
- ✓ Se concluye que si desde el punto de vista higienico-sanitario el parámetro principal de seguridad del producto son valores de pH inferiores a 4 el proceso se podría para en el control del día 21. De igual manera si se pretenden conseguir los máximos valores de

capacidad antioxidante el proceso de fabricación se debería parar en este mismo momento.

- ✓ La variedad Temprano mostró los valores más altos iniciales y finales de la capacidad antioxidante. Sin embargo fue la variedad que mostró peor evolución de las características organolépticas del ajo negro: menor contenido en azúcares, Brix y la que alcanzó valores más ácido en el final del proceso.

En el segundo Artículo 3 se concluye que:

- ✓ Es la primera vez que se realiza una relación entre la caracterización físico-química y las actividades biológicas del ajo blanco y negro. Se siguieron estudios sistemáticos, integrados y multifocales que evaluaron la toxicidad, la antigenotoxicidad, la genotoxicidad, la antigenotoxicidad, la longevidad, la citotoxicidad y las propiedades pro-apoptóticas de los diferentes tipos de ajo para proponer el ajo negro como alimento nutracéutico.
- ✓ Cabe mencionar que hemos utilizado material de ajo entero en todos los ensayos in vivo e in vitro probados mientras tanto la mayor parte de los datos disponibles en la literatura provienen de extractos pero no de material crudo.
- ✓ Al analizar las propiedades físico-químicas de los diferentes ajos estudiados en esta investigación, se destaca las cualidades mejoradas que alcanza el ajo negro de 13 días con respecto al otro ajo negro procesado y también al ajo fresco.
- ✓ . El 0C1 ajo negro (13 días de edad) mostró un peso similar y °Brix como el ajo crudo. Por otra parte, ese ajo negro mejoró el contenido de polifenoles y el porcentaje de inhibición con respecto al ajo blanco y también con los otros tipos de ajo negro si tenemos en cuenta el tiempo de procesamiento.
- ✓ Todos los tipos de ajo eran seguros sin mostrar toxicidad.
- ✓ 0C1 (13 días de edad) de ajo negro mostró una ligera protección contra el tóxico oxidativo.
- ✓ Con respecto al potencial genotóxico, todo el ajo crudo y procesado no era genotóxico, con

la excepción de la mayor concentración de ajo fresco. Exhiben efectos antígenotóxicos cuando los discos imaginales se tratan con el peróxido de hidrógeno de genotoxina.

- ✓ Los ensayos de longevidad en *Drosophila* produjeron una extensión significativa de los resultados del ciclo de vida en algunas de las concentraciones ensayadas de blanco y 0C1 y 1C2 (32 días de edad) de ajo negro.
- ✓ Los resultados obtenidos en los experimentos in vitro para la citotoxicidad del ajo fueron esperanzadores. Todo el ajo estudiado indujo una disminución en el crecimiento de células de leucemia. Sin embargo, ningún tipo de ajo fue capaz de inducir la fragmentación del ADN internucleosómico proapoptótico.
- ✓ El presente estudio del ajo negro podría ser útil para comprender no sólo las propiedades antioxidantes de este ajo procesado, sino también sus condiciones óptimas de envejecimiento para maximizar las propiedades biológicas y antioxidantes.
- ✓ Tomando los datos fisicoquímicos y biológicos, los 13 días de envejecimiento de ajo negro ha demostrado ser el mejor nutracéutico, sin embargo hemos de señalar que las características organolépticas esperadas en el ajo negro, no son satisfactorias con este tiempo de envejecimiento.

ANEXO . Artículo publicado.

Toledano -Medina M Ángeles, Pérez-Aparicio Jesús, Moreno-Rojas Rafael, Merinas Amo Tania.
“Evolution of some physicochemical and antioxidants properties of black garlic whole bulbs and peeled cloves” Food Chemistry 199 (2016) 135-139.



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

Food Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/foodchem

Evolution of some physicochemical and antioxidant properties of black garlic whole bulbs and peeled cloves



Toledano-Medina M. Angeles^{a,*}, Pérez-Aparicio Jesús^a, Moreno-Rojas Rafael^b, Merinas-Amo Tania^c

^aInstituto de Investigación y Formación Agraria y Pesquera, Avda. Félix Rodríguez de la Fuente sn, Palma del Río, Córdoba 14700, Spain

^bDpto. Bromatología y Tecnología de los Alimentos, Campus Rabanales, ed. Darwin – anexo Universidad de Córdoba, Córdoba, Spain

^cDpto. Genética, Universidad de Córdoba Edificio Gregor Mendel, primera planta ala oeste, Campus Rabanales, 14071 Córdoba, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 29 May 2015

Received in revised form 21 November 2015

Accepted 28 November 2015

Available online 30 November 2015

Keywords:

Whole black garlic bulbs

Peeled black garlic cloves

Heat-treatment

Polyphenols

Antioxidant capacity

Browning intensity

pH

Soluble solid content

ABSTRACT

Black garlic was processed at three different temperatures of heat treatment (72°, 75° and 78 °C) and close to 90% of relative humidity. Two types of material source were used: whole bulbs and peeled cloves. Total soluble solids content (°Brix), pH, water activity (a_w), browning intensive (L value), total polyphenol content, antioxidant capacity and total polyphenol index of the raw and heated garlic were determined. This study showed the changes occurring in the physicochemical and antioxidant properties of the garlic during the heat-treatment evolution. The soluble solids content (°Brix) in garlic increased gradually and the pH decreased in whole bulbs and peeled garlics. The polyphenol content measured by the Folin-Ciocalteu method showed a significant increase during the heat-treatment in all the cases. Also, the antioxidant capacity measured by the ABTS radical increased significantly during the heat-treatment.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Garlic has been considered in many cultures to be a food with exceptional therapeutic qualities. The properties beneficial to health of garlic have been described in many research works describing its preventive and even curative effects in many diseases (Bayan, Koulivand, & Gorji, 2014; Milner, 2010; Omar, 2013; Tsai, Chen, Sheen, & Lii, 2012). However, raw garlic consumption is not very widespread mainly due to its characteristic pungent taste. Therefore, many new industrial processes are being investigated in order to obtain garlic products with improved organoleptic properties retaining and even enhancing its beneficial properties. This is the case of black garlic, a product traditionally manufactured in southeast Asia and recently extended to other garlic producing areas like California (U.S.A.), Argentina, Canada and Europe.

Black garlic is manufactured by keeping raw garlic in a temperature and humidity controlled room for several days. The changes in the processing length depend mainly on the temperature. If the

processing temperature is high then the processing duration is shorter. Previous reports have described processing temperatures of between 40–90 °C and heating times of between 5–45 days (Bae, Cho, Won, Lee, & Park, 2014; Sasaki, Lu, Machiya, Tanahashi, & Hamada, 2007; Wang, Feng, Liu, & Yan, 2010). At the end of the heat-treatment, black garlic is partly dehydrated. Finally whole bulbs or peeled cloves of black garlic are packaged in plastic or glass containers without adding any preservatives.

The physicochemical characteristics of black garlic and raw garlic are very different (Choi et al., 2008). During heating, raw garlic undergoes intensive Maillard browning. In early days of heating, caramel and brown tones appear and a few days later the garlic changes its color to black. Black garlic has a rubbery texture and its taste is bittersweet without the characteristic pungent flavor of raw garlic.

There are many reports of bioassays on the beneficial effects on health of black garlic (Lee et al., 2009; Sato, Kohno, Hamano, & Niwano, 2006; Seo et al., 2009; Wang et al., 2010). However, few reports describe black garlic processing. The aim of this study was to evaluate, through different analytical techniques, some physicochemical and antioxidants properties of black garlic produced at three different temperatures, comparing two different products as raw material source, whole bulbs and peeled cloves.

* Corresponding author.

E-mail addresses: mangeles84@hotmail.com (M.A. Toledano-Medina), jesus.perez.aparicio@juntadeandalucia.es (J. Pérez-Aparicio), rafael.moreno@uco.es (R. Moreno-Rojas), tania.meram@gmail.com (T. Merinas-Amo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.11.128>
0308-8146/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

2. Materials and methods

2.1. Samples

Black garlic was manufactured at three different heating temperatures (72 °C, 75 °C and 78 °C) with relative humidity of nearly 90%. Raw garlic samples and samples taken (whole bulbs and peeled cloves) during the aging of garlic were analyzed. Sampling was made at different times depending on the heating temperature. Thus, when the heat treatment was at 78 °C, samples were taken after 5, 10 and 14 days of heat treatment; at 75 °C, samples were taken after 7, 14 and 21 days of heat treatment, and at 72 °C, samples were taken after 11, 24 and 33 days of heat treatment.

All samples were crushed and divided into three sub-samples. A previous peeling before crushing was needed in whole garlic bulbs.

2.2. Measurement of soluble solids content, pH, a_w , and browning intensity

Total soluble solids content (°Brix), pH, water activity (a_w), and browning intensity (L value) were determined in all samples during heat treatment. Determinations in duplicate were carried out. Garlic soluble solids (°Brix) were measured by an *Abbe Refractometer*. Garlic pH was measured with a pH meter *Crison Basic 20*. Garlic water activity (a_w) was measured with an *Aqualab Series 3/3TE* meter with a temperature stabilizer. Garlic browning intensity was determined by a *Konica Minolta CR-410 Cromameter colorimeter*. L value was taken because this reading corresponds to product luminescence ($L-100$ = white; $L-0$ = black).

2.3. Total polyphenol content, antioxidant capacity and total polyphenol index

A *Perkin Elmer Lambda 20 UV VIS spectrophotometer* was used to analyze raw and heated garlic, total polyphenol content, antioxidant capacity and total polyphenol index. A previous garlic extraction was prepared to analyze antioxidant properties. Before this, all samples were lyophilized and five extracts per sample were obtained. Garlic extract was prepared dissolving 0.3 g of the lyophilized sample in 10 ml of a mixture at 50% v/v of ethanol and distilled water. Next, samples were stirred during one hour and then filtered using a Buchner funnel with *Whatman paper* into a vacuum flask connected to a vacuum pump filter. The filtered extract was leveled at 25 ml with a hydroalcoholic solution of 50% v/v.

The polyphenol concentration of garlic samples was determined by *Folin-Ciocalteu method* (Singleton, Orthofer, & Lamuela-Raventos, 1999). To a volumetric 25 ml flask, 0.5 ml of extract, 10 ml of distilled water, 1 ml of *Folin-Ciocalteu* reagent and 3 ml of carbonate sodium 20% w/v were added, and diluted to volume (25 ml) with distilled water. The mixture was heated at 50 °C during 5 min to accelerate the coloration reaction. Subsequently, it was cooled with water and the reading was performed in the *spec troPHOTO* meter at 765 nm. The reading was compared to a calibration curve prepared with different gallic acid solutions: 75, 100, 200, 250, 300 ppm. Polyphenol content results were expressed considering the dilution of the sample (0.3 g in 25 ml) in grams of gallic acid equivalent per kilogram of lyophilized sample.

Raw and heated garlic antioxidant capacity was determined by *ABTS radical method* (Re et al., 1999). A mix of 2.557 ml of a solution of 7 mM *ABTS reagent* and 0.333 ml of a solution of 2.25 mM potassium persulfate in distilled water was made. The prepared solution was stored in darkness during 16 h, enough time for the radical formation (*ABTS[•]*). Then, 0.15 ml of the *ABTS[•]* solution was diluted in 15 ml of ethanol. The absorbance value at 734 nm was adjusted near 0.7 (A_0). Next, 0.980 ml of *ABTS[•]* solution and 0.02 ml of garlic

extract sample were added. After stirring it, the absorbance was read at 734 nm after 7 min (A_1). The inhibition percentage was calculated by the following expression:

$$\% \text{ inhibition} = (A_0 - A_1) * 100/A_0$$

A calibration curve was built with the following Trolox concentrations: 0.1; 0.5; 1 and 1.5 mM. Considering the sample dilution, results were expressed in mmol Trolox-equivalent per kilogram of lyophilized sample.

Total polyphenol index was calculated multiplying the garlic extract absorbance reading at 280 nm per the sample dilution.

2.4. Statistical analysis

All results obtained in this study were analyzed by an analysis of variance. Average values at different processing times were compared according to the Tukey test.

3. Results and discussion

3.1. °Brix, pH, a_w y browning intensity

Soluble solids content, pH, water activity and browning intensity are shown in Table 1. It is noted that the evolution of the physico-chemical characteristics in whole garlic bulbs was very similar to that of peeled garlic cloves. During heat-treatment, in the garlic, its soluble solid content (°Brix) and browning intensity increased, and its pH and a_w decreased. However, it was observed that in whole garlic bulbs and peeled cloves the soluble solid content, pH and browning intensity changed faster if the temperature was higher. Similar °Brix readings were obtained in whole garlic bulbs and peeled garlic cloves even from different initial °Brix readings. The increase in garlic soluble solid content could be the reason for the characteristic black garlic sweetness (Sasaki et al., 2007) (see Fig. 1).

At the end of the heat-treatment, homogeneous Tukey tests showed °Brix readings always higher than raw garlic ones. Significant differences in °Brix readings at three temperatures and in the two types of products manufactured/made (Table 1) were observed. At the end of the heat-treatment, whole garlic bulbs °Brix readings with heat-treatment at 78 °C and 75 °C (44.00 and 45.25, respectively) were lower than those of peeled garlic cloves °Brix readings (45.33 and 47.5, respectively).

In Fig. 2 it is shown how the pH decreased during the manufacturing process. Raw garlic pH was nearly 6 (5.93 and 6.31 in whole garlic bulbs and peeled garlic cloves, respectively) whereas black garlic pH at the end of heat-treatment reached values below 3.8 in all the cases. Changes in pH whole bulbs and peeled cloves samples were very similar. It was demonstrated how if the heat-treatment of the garlic was at a higher/high temperature then the pH decreased more rapidly (Fig. 2).

At higher temperatures (78 °C) lower pH values were reached. The same observation has recently been described Bae et al., (2014). A heating temperature of over 60 °C and a decrease in pH below 4.2 are two important factors for preventing the possibility of anaerobic bacteria proliferation.

Water activity (a_w) decreased less than other parameters because black garlic was manufactured maintaining high relative humidity. However, raw and black garlic a_w at the end of heat-treatment showed significant differences (Table 1).

At 78 °C, whole garlic bulbs a_w showed significant differences in all the samples. However, at this temperature, peeled garlic cloves a_w showed significant differences between samples taken after 5 and after 10 days of heat-treatment. At 75 °C, significant differences were observed in whole garlic bulbs and peeled garlic cloves between the 7th and 14th days of heat-treatment.

At 72 °C, black garlic manufactured with whole garlic bulbs showed significant differences in samples taken after 24 days of aging. Nevertheless, peeled garlic samples processed at 72 °C showed significant differences in the three last samplings. Finally, black garlic a_w after the heat-treatment under high humidity conditions does not guarantee the absence of contamination by fungi and aerobic bacteria. Therefore, in addition to a final drying ($a_w < 0.85$), the black garlic should be packed in a protective atmosphere or applying a pasteurization treatment to it.

As Table 1 shows, browning intensity in whole bulbs and peeled garlic cloves was different in raw garlic samples, 36.05 and 52.05, respectively, due mainly to the effects of mechanical peeling and a longer exposure to air and light in the case of peeled garlic. This difference is compensated for in a few days by the heat treatment (Table 1). Despite this, at the end of the heat-treatment, a similar browning intensity was reached.

It was observed that at higher temperatures garlic browning intensity happened earlier. Garlic color finally changed to dark brown and black, mainly due to the formation of numerous compounds resulting from the reaction of non-enzymatic browning or Maillard.

3.2. Total polyphenols content, antioxidant capacity and total polyphenols index

When comparing the evolution between raw garlic and finished black garlic, it is notable that a significant increase is observed in the total polyphenol content, antioxidant capacity and total polyphenol index. The antioxidant power of polyphenols has been demonstrated (Kang, Park, & Lee, 1996) so it seems logical to state that an increase in polyphenol content in black garlic is due to antioxidant properties in this product.

During heat-treatment, unstable compounds in raw garlic are transformed into stable soluble compounds with a high antioxidant power (Corzo-Martinez, Corso, & Villamiel, 2007; Imai et al., 1994). In previous studies on black garlic, it has been reported that this increase in its antioxidant capacity could be due to the increase in polyphenols and S-allyl-cysteine, a compound derived from alliin (Lee et al., 2009).

Table 2 shows the concentration of polyphenols, the Trolox equivalent antioxidant capacity and the total polyphenol index in whole bulbs and peeled garlic cloves at the three different processing temperatures. The two types of processed garlic had different

Table 2

Total polyphenol content (gr. of Gallic/kg of lyophilized sample), antioxidant capacity (Trolox mmol/kg sample) and total polyphenol index (IPT) of raw garlic ($t = 0$) and black garlic from whole bulbs and peeled garlic cloves at different times ($t = 0, 5, 10, \dots$) during heat-treatment and various processing temperatures (78, 75 and 72 °C).

t	Polyphenols		Cap. antioxidant		IPT	
	Whole bulbs	Peeled garlic	Whole bulbs	Peeled garlic	Whole bulbs	Peeled garlic
0	5.13 ± 0.04a	3.20 ± 0.07a	16.03 ± 0.41a	11.75 ± 0.27a	395.70 ± 9.60a	290.6 ± 7.34a
78 °C						
5	3.98 ± 0.16a	3.11 ± 0.08a	30.85 ± 1.29a	25.77 ± 1.38a	302.00 ± 6.57a	257.8 ± 2.83a
10	11.40 ± 0.88b	11.31 ± 0.68b	92.17 ± 6.86b	95.54 ± 5.35b	958.4 ± 54.20b	875.2 ± 47.82b
14	14.78 ± 0.76b	17.56 ± 0.31c	100.47 ± 3.35b	97.18 ± 1.87b	1371.8 ± 83.46c	1576.9 ± 71.02c
t	***	***	***	***	***	***
75 °C						
7	3.86 ± 0.45a	4.14 ± 0.11a	30.37 ± 1.39b	31.96 ± 1.26b	285.3 ± 12.32a	292.4 ± 2.28a
14	11.68 ± 0.31b	10.43 ± 0.19b	91.00 ± 1.65c	81.87 ± 1.74c	776 ± 19.30b	760.7 ± 21.47b
21	16.32 ± 0.14c	18.77 ± 0.30c	97.74 ± 2.18d	111.27 ± 2.41c	1558 ± 37.78c	1558 ± 37.47c
t	***	***	***	***	***	***
72 °C						
11	5.30 ± 0.16	4.41 ± 0.23a	33.83 ± 1.84b	34.41 ± 1.12b	334.5 ± 6.01a	273 ± 4.34a
24	16.08 ± 0.46b	16.39 ± 0.39b	115.05 ± 1.69c	109.35 ± 2.18c	1558 ± 30.80b	1430.1 ± 68.48b
33	14.85 ± 0.42b	17.78 ± 0.29c	109.65 ± 1.57c	107.86 ± 1.34c	1884.4 ± 28.35c	1822.9 ± 20.17c
t	***	***	***	***	***	***

Values are means ± standard error (SE) (n = 6). Different letters (a, b, c, d) in the same column show significant differences ($p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

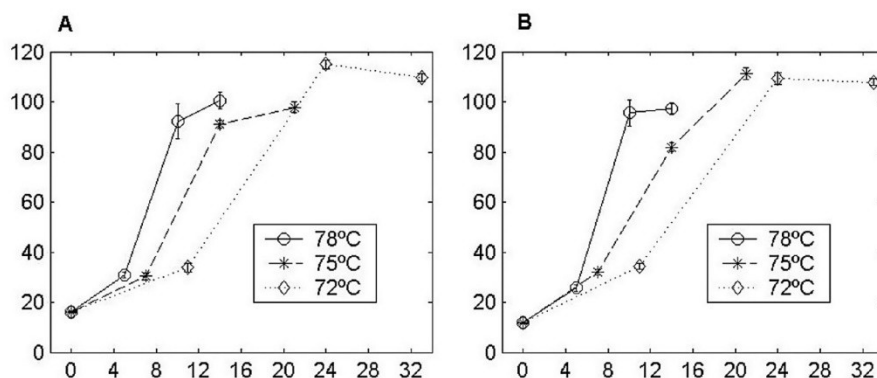


Fig. 3. Evolution of antioxidant capacity (mean ± standard error) in black garlic from whole bulbs (A) and peeled garlic cloves (B) during heat-treatment at different temperatures.

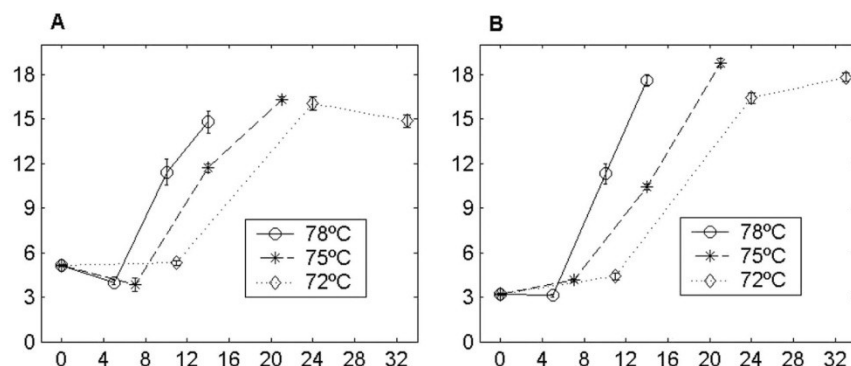


Fig. 4. Evolution of polyphenols content (mean \pm standard error) in black garlic from whole bulbs (A) and peeled garlic cloves (B) during heat-treatment at different temperatures.

amounts of polyphenols and antioxidant capacity. At the end of the heat-treatment, polyphenol content and antioxidant capacity experienced a greater rise in the case of peeled garlic cloves at all temperatures.

Total polyphenols content in garlic increased during the aging in all the heating processes in this study (Fig. 3). The higher concentration of polyphenols content was obtained in black garlic from peeled cloves. The amount of polyphenols increased 3-fold in whole black garlic bulbs and about 6-fold in peeled black garlic cloves (Table 2). Previous black garlic studies carried out with whole bulbs have described an increase in polyphenol content of about 2.5-fold, compared to raw garlic (Jang, Seo, & Lee, 2008). Significant differences in each sampling, especially between the two initial and the final two samplings, were observed. The higher concentration of polyphenol values was shown in black garlic manufactured/made with peeled garlic.

Antioxidant capacity in whole garlic bulbs and peeled garlic cloves was very similar (Fig. 4). If the antioxidant capacity obtained after 14 days of aging, both in whole bulbs and peeled garlic cloves is compared, the highest value was reached at 78 °C. At the end of the heating process, a higher increase in antioxidant capacity of garlic was observed, i.e. 9.5-fold and 6.5-fold in whole bulbs and peeled garlic, respectively (Table 2). Lee et al. described a 4.5-fold increase in black garlic antioxidant capacity (2008).

4. Conclusions

Black garlic differs from fresh garlic in its dark color, higher soluble solid values, lower pH and higher concentration of polyphenols and antioxidant capacity. Small temperature variations in the processing (72, 75 to 78 °C) influence the speed of change; the higher temperature produces a quick rise in °Brix, the lowering of the pH, color change and increased in polyphenols content and antioxidant capacity.

Black garlic from previously peeled garlic is a similar product to the one traditionally manufactured. More research work is needed to study the difference between the black garlic made from whole bulbs and peeled garlic cloves.

References

- Bae, Sang Eun, Cho, Seung Yong, Won, Yong Duk, Lee, Seon Ha, & Park, Hyun Jin (2014). Changes in S-allyl cysteine contents and physicochemical properties of black garlic during heat treatment. *Food Science and Technology*, 55, 397–402.
- Bayan, L., Koulivand, P. H., & Gorji, A. (2014). Garlic: A review of potential therapeutic effects. *Avicenna Journal of Phytomedicine*, 4(1), 1–14.
- Choi, D. J., Lee, S. J., Kang, M. J., Cho, H. S., Sung, N. J., & Shin, J. H. (2008). Physicochemical characteristics of black garlic (*Allium sativum* L.). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*, 37(4), 465–471.
- Corzo-Martinez, M., Corso, N., & Villamiel, M. (2007). Biological properties of onions and garlic. *Trends in Food Science, Technology*, 18, 609–625.
- Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H., & Itakura, Y. (1994). Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Medica*, 1994(60), 417–420.
- Jang, E. K., Seo, J. H., & Lee, S. P. (2008). Physiological activity and antioxidative effects of aged black garlic (*Allium sativum* L.) extract. *Korean Society of Food Science and Technology*, 40, 443–448.
- Kang, Y. H., Park, Y. K., & Lee, G. D. (1996). The nitrite scavenging and electron donating ability of 229 phenolic compounds. *Korean Society of Food Science and Technology*, 230(28), 232–239.
- Lee, Y.-M., Gweon, O.-C., Seo, Y.-J., Im, J., Kang, M.-J., Kim, M.-J., & Kim, J.-I. (2009). Antioxidant effect of garlic and aged black garlic in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Nutrition Research and Practice*, 3, 156.
- Milner, J. A. (2010). Garlic and cancer prevention. In J. A. Milner & D. F. Romagnolo (Eds.), *Bioactive compounds and cancer. Nutrition and health* (pp. 567–588). Humana Press.
- Omar, S. H. (2013). *Garlic and cardiovascular diseases. Natural products*. Springer [3661–3696].
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., & Rice-evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine*, 26, 1231–1237.
- Sasaki, J., Lu, C., Machiya, E., Tanahashi, M., & Hamada, K. (2007). Processed black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance anti-tumor potency against mouse tumors. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 1(2), 278–281.
- Sato, E., Kohno, M., Hamano, H., & Niwano, Y. (2006). Increased anti-oxidative potency of garlic by spontaneous short-term fermentation. *Plant Foods for Human Nutrition*, 61, 157–160.
- Seo, Y. J., Gweon, O. C., Im, J. E., Lee, Y. M., Kang, M. J., et al. (2009). Effect of garlic and aged black garlic on hyperglycemia and dyslipidemia in animal model of type 2 diabetes mellitus. *Journal of Food Sciences and Nutrition*, 14(1), 1–7.
- Singleton, V. L., Orthofer, R., & Lamuela-Raventos, R. M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of the Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 152–178.
- Tsai, C.-W., Chen, H.-W., Sheen, L.-Y., & Lii, C.-K. (2012). Garlic: Health benefits and action. *Biomedicine*, 2(1), 17–29.
- Wang, D. Y., Feng, J., Liu, J., & Yan, M. (2010). Black garlic (*Allium sativum*) extracts enhance the immune system. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 4, 37–40.