



## ANÁLISE FITOQUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ALHO

Aluísio Marques da Fonseca<sup>1</sup>, Blasco Quefi<sup>2</sup>, Juan Carlos Alvarado Alcócer<sup>3</sup>, Olienai de Ribeiro de Oliveira Pinto<sup>4</sup>, Rubson Mateus Matos Carvalho<sup>5</sup>

<sup>1</sup>Professor Doutor da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Redenção-CE, Brasil.

<sup>2</sup>Graduação em Ciências da Natureza e Matemática, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Redenção-CE, Brasil.

<sup>3</sup>Professor Doutor da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Redenção-CE, Brasil.

<sup>4</sup>Doutora, Bolsista do Programa Nacional de Pós-Doutorados (PNPD) / CAPES, Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Redenção-CE, Brasil. E-mail: agron.olielaide@gmail.com.

<sup>5</sup>Mestrando no Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis (MASTS) da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), Redenção-CE, Brasil.

Recebido em: 06/04/2019 – Aprovado em: 10/06/2019 – Publicado em: 30/06/2019  
DOI: 10.18677/EnciBio\_2019A10

### RESUMO

O alho (*Allium sativum* L.) é uma planta herbácea que desde da antiguidade é utilizado às folhas e os bulbos na medicina popular e na culinária. Portanto, objetivou-se avaliar o perfil fitoquímico e atividades biológicas do alho. A análise fotoquímica foi avaliada na presença do extrato etanólico das folhas que apresentou teste positivo para cumarinas, terpenoides, esteroides e alcaloides. A determinação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de sequestro do radical DPPH, com a concentração 0,06 mM. A leitura absorvâncias foi feita por espectrofotômetro UV/Vis, com comprimento de onda na região de 520 nm. Como resultado da avaliação antioxidante, observou-se que a maior concentração da atividade inibitória foi 66,5% para as folhas e 87,65 % para os bulbos de alho. O IC<sub>50</sub> foi calculado a partir da curva de regressão linear e equação da reta. A concentração do extrato necessário para inibir 50% do radical livre DPPH, no extrato etanólico das folhas apresentou um IC<sub>50</sub> de 1.041,6 ppm, e o extrato etanólico dos bulbos mostrou um IC<sub>50</sub> de 282,6 ppm. As respostas de toxicidades dos extratos etanólico dos bulbos e das folhas foram considerados satisfatórios. Os extratos das folhas que foram testadas no crustáceo artemia salina, apresentaram uma dose letal (DL<sub>50</sub>) de 631,255 ppm, e o extrato dos bulbos com dose letal (DL<sub>50</sub>) de 39,355 ppm. A ausência de toxicidade estimula a realização de estudos adicionais na atividade biológica para a determinação de propriedades biológicas e terapêuticas desta espécie.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Allium Sativum* L., Fitoquímica, DPPH, Potencial antioxidante, Toxicidade.

## PHYCHOCHEMICAL ANALYSIS AND LIVESTOCK BIOLOGICAL ACTIVITIES

### ABSTRACT

Garlic (*Allium sativum* L.) is an herbaceous plant that from ancient times leaves and bulbs are used in folk medicine and cooking. Therefore, the present work aimed to evaluate the phytochemical profile and biological activities of garlic. The photochemical analysis was evaluated in the presence of the ethanolic extract of the leaves that presented positive test for coumarins, terpenoids, steroids and alkaloids. The antioxidant activity determination was performed by the DPPH radical sequestration method, with a concentration of 0.06 mM. The absorbance reading was done by UV/Vis spectrophotometer, with wavelength in the region of 520 nm. Because of the antioxidant evaluation, it was observed that the highest concentration of the inhibitory activity was 66.5% for the leaves and 87.65% for the garlic bulbs. The IC<sub>50</sub> was calculated from the linear regression curve and equation of the line. The concentration of the extract needed to inhibit 50% of the DPPH free radical in the ethanolic extract of the leaves had an IC<sub>50</sub> of 1041.6 ppm, and the ethanolic extract of the bulbs showed an IC<sub>50</sub> of 282.6 ppm. The toxicity responses of the ethanolic extracts of bulbs and leaves were considered satisfactory. Leaf extracts tested on crustacean artemia saline presented a lethal dose (LD<sub>50</sub>) of 631.255 ppm and the extract of bulbs with lethal dose (LD<sub>50</sub>) of 39.355 ppm. The absence of toxicity stimulates the realization of additional studies in the biological activity for the determination of the biological and therapeutic properties of this species.

**KEYWORDS:** *Allium Sativum* L., Phytochemistry, DPPH, Antioxidant potential, Toxicity.

### INTRODUÇÃO

O alho (*Allium sativum* L.) é uma planta de clima temperado, cultivada em todo o mundo e utilizado como especiaria no preparo de alimentos (OLIVEIRA et al., 2015). Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que mais tem contribuído de forma significativa para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes têm grande valor agregado devido às suas aplicações como medicamento, cosméticos, alimento e agroquímicos (PINTO et al., 2002).

O homem em busca da cura de enfermidades passou a utilizar produtos vegetais em forma de infusão ou como condimentos. Através deste uso informal das plantas, os primórdios realizaram grandes descobertas que hoje se tornaram o centro dos estudos da química e da medicina moderna (CUNHA et al., 2016).

Na medicina popular, o alho é utilizado com a função de prevenir e tratar infecções diversas. Estudos científicos comprovaram que o extrato do alho é capaz de estimular o sistema imunológico, gerando uma ação pró-inflamatória a partir da proliferação e maior produção de citocinas pró-inflamatórias sem que se observe efeito hepatotóxico. A comprovação científica dos benefícios associados à baixa toxicidade do alho e ao estímulo do sistema imune permite que este vegetal seja administrado no tratamento e prevenção de vários processos inflamatórios (LOZANO et al., 2015).

A planta de alho é caracterizada por folhas longas e achatadas e um bulbo (cabeça) que é dividido em dentes (bulbilhos), rico em alicina que possui ação antiviral, antifúngica e antibiótica. Além de, possuir os altos teores de zinco (Zn) e selênio (Se), ambos apresentam natureza antioxidante (DALONSO et al., 2009). Há diversos anos o alho e seus extratos têm sido usados para tratar infecções. A maior concentração de fitoquímicos encontra-se nos bulbilhos. Vários fitoquímicos

bioativos foram identificados sendo os de maior destaque os compostos sulfurados (FONSECA et al., 2014).

O extrato aquoso de alho, popularmente, é utilizado com a finalidade de prevenir e de tratar afecções diversas, como artrite, dor de dente, tosse crônica, constipação, infestação parasitária, picadas de cobras e insetos, doenças ginecológicas e outras infecções de modo geral (BAYAN et al., 2014). Diversos metabólitos secundários são utilizados como potencial biológico servindo de base fundamental para medicamentos tradicionais. Alguns pesquisadores foram descobrindo novos estudos científicos comprovaram que o extrato do alho é capaz de estimular o sistema imunológico, gerando uma ação pró-inflamatório a partir da proliferação e amplificação da medida das células, além da maior produção de citoxinas pró-inflamatórias sem que se observe efeito hepatotóxico (LOZANO et al., 2015).

A técnica de análise com *Artemia salina* é apontado como uma forma simples de bioensaio para pesquisa preliminar de atividade com produtos naturais provenientes de plantas. Por essa técnica, é possível verificar a concentração letal 50% (DL<sub>50</sub>) de componentes ativos e extratos em meio salino, o que é manifestado pela toxicidade de componentes ativos, frações ou extratos de produtos naturais frente ao organismo marinho *A. salina* (LIMA NETO et al., 2015).

O efeito curativo do alho deve-se à composição de substâncias biológicas ativas, que incluem enzimas, como a alinase; compostos sulfurados, destacando-se a alina; e componentes produzidos enzimaticamente, como a alicina (MAJEWSKI, 2014). Já foram identificados cerca de 30 componentes do alho que possuem efeito terapêutico. Lima Neto et al. (2015) relatam que os compostos fenólicos possuem um ou mais grupos hidroxilas ligados a um anel aromático destacam-se de outras classes de metabólitos secundários porque são amplamente distribuídos e por apresentarem várias funções ecológicas e inúmeras atividades farmacológicas, cientificamente comprovadas, sendo representadas por taninos, flavonoides e cumarinas. Neste estudo, objetivou-se avaliar o perfil fitoquímico e as atividades biológicas das folhas e dos bulbos do alho e analisar a toxicidade do extrato da planta do alho.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Coleta e obtenção dos extratos vegetais

Os bulbos e as folhas do alho foram coletados no município de Aratuba, Maciço de Baturité, Ceará, nas coordenadas 4°23'46"S e 39°1'7"W. Foram coletados 1 kg de bulbos e 1 kg de folhas de alho.

Depois da coleta, os materiais vegetais frescos foram secos na estufa com temperatura de 45°C, durante sete dias, posteriormente foram trituradas em liquidificador industrial.

Em seguida, foi adicionado o solvente orgânico (etanol) P.A. durante três dias em temperatura ambiente. Filtrou-se e evaporou-se o solvente com rota-evaporador, controlado a temperatura de 50 °C. Assim, obteve-se o extrato bruto etanólico dos bulbos e das folhas do alho.

### Identificação dos metabólitos secundários no extrato etanólico do alho

Os extratos brutos etanólico dos bulbos e das folhas do alho foram utilizados para teste de fotoquímica para identificação das classes dos metabólitos secundários. Inicialmente preparou a solução do extrato aquoso, em seguida pesou-

se 600 mg de amostra dos extratos brutos e dissolveu-se em uma solução hidroalcolica (80%).

A metodologia utilizada para a detecção dos grupos de metabólitos secundários foi proposta por Vishwakarma et al. (2014) e Silva e Lima (2016). No extrato etanólico das folhas, foram realizados os seguintes testes: Alcalóides, Cumarinas, Flavonóides, Taninos, Saponinas, Terpenóides e Esteróides.

Para identificação de alcalóides, utilizou 2,0 mL da solução estoque, adicionou-se 2,0 mL de HCl (10%) e esquentou-se essa mistura por 10 minutos. Esfriou-se, filtrou-se, dividiu-se o filtrado em três tubos de ensaios e colocaram-se algumas gotas dos reativos de reconhecimento: Dragendorff e Mayere. Uma leve turbidez ou precipitado (respectivamente roxo a laranja, branco a creme e marrom) evidencia a possível presença dos mesmos.

No ensaio para identificação de cumarinas, utilizou um tubo de ensaio e colocou 2,0 mL da solução estoque, adicionou-se 2 mL de NaOH 10%. Após a adição, formou-se uma coloração amarela, que indicam a presença de cumarinas. No teste para identificação de Flavonóides, colocou-se em um tubo, 2,0 mL de solução estoque, alguns fragmentos de Mg e agregou-se, pelas paredes do tubo, algumas gotas de HCl concentrado. Observou-se a coloração de cor vermelha que é indicativo da presença de flavonóis, flavononas, flavononóis e xantonas e Flavonóides.

Na identificação de Taninos, aplicou-se 2 mL da solução estoque em um tubo de ensaio e adicionou duas gotas de FeCl<sub>3</sub> 10%. Ocorreu o aparecimento de precipitado escuro de tonalidade azul que indicou à presença de taninos hidrossolúveis e verde na presença de taninos condensados.

No ensaio para as saponinas, utilizou 2,0 mL da solução estoque, e adicionou 5,0 mL de água destilada e aqueceu-se em banho maria por 10 minutos. Após resfriamento, agitou-se, deixando em repouso por 20 minutos. Classificou-se a presença de saponinas pela formação de espumas persistente.

Para os terpenóides empregou-se 2 mL da solução estoque e adicionou-se 2 mL de clorofórmio e 4 a 5 gotas de ácido sulfúrico concentrado, formando uma cor marrom vermelho ou o surgimento de colorações que vão do azul ao verde que indicam a presença desse metabólito. Assim, indicativo da presença de terpenóides.

Nos esteróides utilizou-se 2 mL da solução estoque e adicionou-se 2 mL de clorofórmio e 1 mL de ácido sulfúrico concentrado, formação de cor marrom vermelho mutável ou o surgimento de colorações que vão do azul ao verde que foi o indicativo da presença de esteroides.

### **Teste da atividade potencial antioxidante**

A partir do extrato bruto, analisou-se a atividade antioxidante com ensaio de DPPH. O potencial de redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) das amostras foram analisadas sob espectro fotometricamente. Preparou-se a solução etanólica de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) 0,06 mM.

Foram preparados uma solução mãe de 2 mg/mL ou 2000 ppm, onde dissolveu-se a amostra em etanol. A partir da solução mãe, foram diluídos em tubos de ensaio para obter as concentrações de 1500; 1000; 500; 250 e 125 ppm. A partir das concentrações preparadas, reagiu-se a solução etanólico de DPPH com amostras e deixou-se em local escuro durante 30 minutos, para a reação ocorrer. Após esse procedimento, realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV/Vis. na região de 520 nm. O etanol foi utilizado para calibrar o espectro, etanol e DPPH foi utilizado como controle negativo e ácido ascórbico como controle positivo. O ensaio

foi realizado em triplicata. Foi utilizada a metodologia de Silva et al. (2012) e Orlanda e Vale (2015). A porcentagem da atividade antioxidante de radicais livres de DPPH foi calculada pela equação 1:

$$\% \text{ inibição DPPH} = \left( \frac{Abs_{DPPH} - Abs_{Amostra}}{Abs_{DPPH}} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde:

$Abs_{DPPH}$  = absorvância da solução etanólico do radical DPPH;

$Abs_{Amostra}$  = absorvância da amostra após 30 minutos de reação com a solução de DPPH.

O valor de  $IC_{50}$  foi utilizado necessariamente para inibir 50% do sequestro de radical Livre DPPH inicial que foi calculado através da equação da reta do gráfico.

### **Teste de toxicidade frente da *Artemia salina***

O teste de toxicidade utilizando à *artêmia salina* foi realizado através da adaptação da metodologia de Bueno et al. (2015) e Rosa et al. (2016). A avaliação da toxicidade dos extratos e frações foi realizada através do bioensaio com *artêmia salina*. O ensaio foi feito em triplicata durante o teste da avaliação da toxicidade para as folhas e os bulbos do alho. Em seguida, preparou-se a solução de estoque da concentração de  $1 \text{ mg mL}^{-1}$  ou 1000 ppm. Após a eclosão dos ovos, utilizou-se 14 mg dos extratos etanólicos das folhas e dos bulbos e se dissolveu em 14 mL de DMSO a 1%. A solução estoque que foi preparado diluíram-se em cinco tubos de ensaio com diferentes concentrações a partir de (500, 250, 125, 62,5, 31,2 ppm).

Para calcular  $DL_{50}$  foi utilizado o método PROBIT ANALYSIS, e considerou-se baixa toxicidade quando a dose letal 50% ( $DL_{50}$ ) foi superior a  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$  e muito tóxico quando a  $DL_{50}$  foi inferior  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Inicialmente, preparou-se 60 g de sal de cozinha, foram solubilizados em 2000 mL de água destilada. A solução foi transferida para o recipiente e em seguida, foram adicionados os cistos de *Artemia salina*.

A preparação da criação de cistos de *artemia salina* inicialmente, foi com uma solução de sal marinho na concentração  $60 \text{ g L}^{-1}$ , foram solubilizados em balão volumétrico de 2000 mL. O pH foi ajustado entre 8,0 e 9,0. E esta solução foi utilizada para eclosão dos ovos de *Artêmia salina* e no preparo das demais diluições das amostras. O recipiente foi colocado dentro de uma incubadora iluminada por uma lâmpada fluorescente. Em um dos lados desse recipiente, adicionou-se cerca de 40 mg de cistos de *Artêmia salina*. A parte do sistema contendo os cistos foi coberta com papel alumínio, para que os organismos, ao nascerem, fossem atraídos pela luz do outro lado do sistema. A incubação foi feita por um período de 24 horas. Durante todo o ensaio a temperatura foi monitorada como temperatura ambiente  $26^{\circ}\text{C}$  à  $29^{\circ}\text{C}$ .

Após o período de incubação, os organismos-testes (náuplios de *Artemia*) foram expostos às drogas de interesse por 24 horas, utilizando-se tubos de ensaio graduados, cada um contendo 10 náuplios de *Artemia salina* para as concentrações que foram preparadas, previamente selecionados. Os testes foram feitos em triplicata para cada concentração. Além disso, cada droga foi testada três vezes, totalizando 10 ensaios por concentração do composto. Durante o teste foi acompanhado de controle negativo somente de água salina. De acordo com WHO (2009), se a mortalidade nos controles estiver entre 5% e 20%, os resultados com as amostras tratadas são corrigidos usando a equação 2 de Abbott's:

$$\% \text{ mortalidade} = \frac{X - Y}{100 - Y} \times 100 \quad (2)$$

Onde: X = percentual mortalidade na amostra tratada e Y = percentual mortalidade no controle.

### Teste de acetilcolinesterase

Reagentes por poço: 25 µL de iodeto de acetilcolina (15 mM), 125 µL de 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzóico] na solução Tris/HCL com 0,1 M de NaCL e 0,02 M de MgCL<sub>2</sub> .6H<sub>2</sub>O, 50 µL da solução Tris/HCL com 0,1% de albumina sérica bovina, 25 µL da amostra de extrato dissolvida em Acetato de Etila. A preparação das amostras foi de Ext. EtOH do bulbo Alho e Ext. EtOH da folha do alho (2 mg mL<sup>-1</sup>). O padrão foi Fisostigmina (Curva de diluição a partir de 2 mg mL<sup>-1</sup>)

A atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi aferida em placas de 96 poços de fundo chato utilizando leitor Elisa BIOTEK, modelo ELX 800, software "Gen5 V2.04.11", baseando-se na metodologia descrita por ELLMAN et al. (1961). Os dados foram normatizados para estimar as curvas de regressão não linear pelo software estatístico GraphPad Prism v5.01.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Obtenção dos extratos

Na Tabela 1, têm-se os resultados da obtenção dos extratos de folhas e bulbos de 1 Kg do material vegetal. Os bulbos apresentaram uma massa de 13,116 g com rendimento de 5,83 % de extrato e as folhas obtiveram-se 16,05 g de massa representando 5,61 % de rendimento do extrato etanólico.

**TABELA 1.** Resultados dos extratos etanólicos do bulbo e folhas do alho.

Amostra seca	Solventes	Massa (g)	Rendimento (%)
Bulbo (1 kg)	Etanol P. A.	13,116	5,83
Folhas (1 kg)	Etanol P. A.	16,05	5,61

### Identificação dos metabólitos secundários

Na Tabela 2, apresentam-se os resultados dos extratos etanólico das folhas do alho. Nesse teste, observaram-se respostas positivas para cumarinas, terpenoides, esteróides e saponinas. Esses extratos mostraram respostas negativas para taninos, fenóis, flavonoides. As identificações desses metabólitos foram através de reagentes específicos, conforme a Figura 1. Com a presença de metabólitos secundários, foi sinalizado o potencial para atividade antioxidante (BOROSKI et al., 2015) e os outros testes de atividades biológicas.

Carrera et al. (2014) abordam que existem diversas funções atribuídas nos testes fitoquímicos nas plantas, podendo citar: proteção dos vegetais contra incidência de radiações ionizantes, insetos, fungos, vírus e bactérias; atração de agentes polinizadores; ação antioxidante nos fotossistemas; controle da ação hormonal vegetal; ação alelopática e inibição de enzimas.

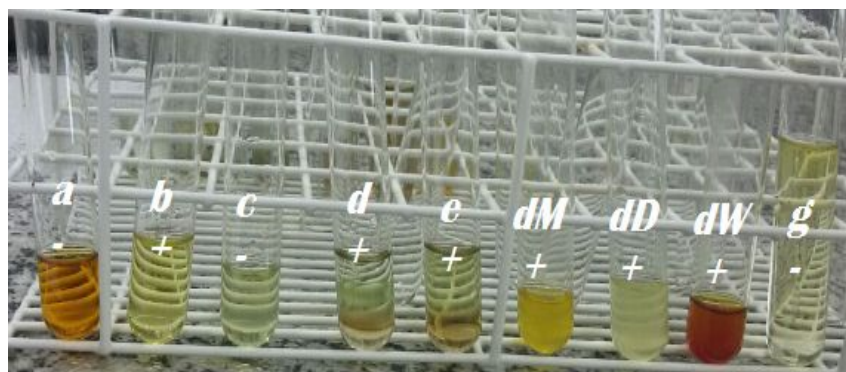
A caracterização dos metabólitos secundários como cumarinas quando se reagiu com o hidróxido de sódio 10% houve a formação da cor amarela. As classes do metabolismo secundárias das cumarinas sempre contribuem na apresentação da atividade citotóxica, anti-HIV1 pela inibição da transcriptase reversa, antifúngica,

inseticida, vasodilatadora coronariana através da inibição da fosfodiesterase e anticoagulante, inibindo a formação de tromboxana nas plaquetas (SCIO, 2004).

**TABELA 2** Identificação dos metabólitos secundários do extrato etanólico de *Allium sativum* L.

Metabólitos secundários	Reações	Extrato das folhas
Taninos	Cloreto férrico 10%	-
Fenóis	Cloreto férrico 10%	-
Cumarinas	Hidróxido de sódio 10%	+
Flavonóides	Shinoda	-
Terpenoides	Salkowski	+
Esteróides	Salkowski	+
Alcalóides	Reagente Meyer	+
Saponinas	Reagente Dragendroff	+
	Formação de espuma	-

+ (positivo) - (negativo)



**FIGURA 1.** Teste Fitoquímico das folhas do alho. a) Taninos e Fenóis, b) Cumarinas, c) Flavonóides, d) Terpenóides, e) Esteroides, f) Alcaloides (Mayer, Dragendroff), g) Saponinas.

Deste método as cumarinas são capazes de inibir a migração de neutrófilos para o local afetado. Este efeito anti-inflamatório do fitoterápico pode ser devido à inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias no local de inflamação. As cumarinas também podem ter atividades antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antiespasmódica e antitumoral (ALVES et al., 2000).

Os terpenóides reagem com o extrato etanólico, clorofórmio e ácido sulfúrico concentrado, identificou-se que formação de cor marrom vermelho e surgimento de colorações que vão do azul ao verde. Os terpenóides são as classes estruturalmente mais variadas de produtos vegetais naturais que vêm sendo utilizados na indústria de flavorizantes, perfumes e outras atividades biológicas relacionados com as atividades terapêuticas (OLIVEIRA, 2016).

Baseados nos resultados, os esteroides quando reagem com o teste de Salkowski apresentou-se na cor marrom vermelho mutável. Esteroides são formados por triterpenos por meio da rota biossintética via mevalonato. Apresentam a cor de vermelho ou marrom no teste positivo. Existem relatos de atividade anti-inflamatória e antibacteriana. Os triterpenos são uma classe mais estruturalmente diversificada (DOMINGO, 2009) e são utilizados em alguns fármacos (OLIVEIRA, 2016).

Os alcaloides podem ser encontrados nos bulbos e folhas do alho. Este reagente constitui uma solução de iodo bismutado de potássio  $K(BiI_4)$  em ácido diluído que formam precipitados laranja avermelhados quando entram em contato com os alcaloides ou compostos nitrogenados (PAULA, 2015). Os alcaloides apresentam carácter básico, contendo um ou mais átomos de nitrogênio e podem ter ação fisiológica no ser humano ou em outros animais. São utilizados nas aplicações terapêuticas para o tratamento de desordem lisossomal, infecções de doenças autoimunes com artrite e esclerose múltipla (TOMCZAM; REICHETEER, 2013). Alcaloides apresentam atividade antitumoral que inibem a síntese de DNA e RNA e proteínas, provavelmente, por intercalação na dupla hélice do DNA e por ligação com ácidos nucleicos (HYACIENTH et al., 2015).

Através da análise fitoquímica preliminares, foi possível identificar algumas classes de metabólitos secundários de interesse farmacológico presentes no extrato em estudo com o objetivo de se fazer alguns isolamentos para a purificação do extrato do alho, principais de grupos metabólitos secundários presentes no teste obtendo: cumarinas, terpenóides, esteróides e alcalóides.

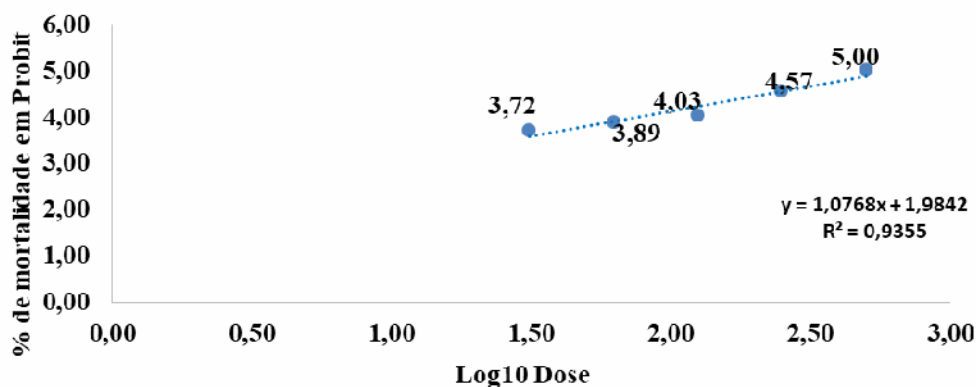
### Teste de toxicidade frente na *Artêmia salina*

Os resultados obtidos dos testes de toxicidades dos extratos etanólicos das folhas de alho para a *Artemia salina* estão mostrados na Tabela 3 e na Figura 2.

**TABELA 3.** Resultado do teste toxicidade do extrato etanólico das folhas do alho frente à *Artêmia salina*.

Concentração (ppm)	Total de larvas	Larvas mortas	Mortalidade %	DL <sub>50</sub> (ppm)
500	30	15	50	631,255
250	30	10	33,3	
125	30	5	16,6	
62,5	30	4	13,3	
31,2	30	3	10	
Controle	30	0	0	

**Cálculo de DL<sub>50</sub> utilizando análise do Probit**



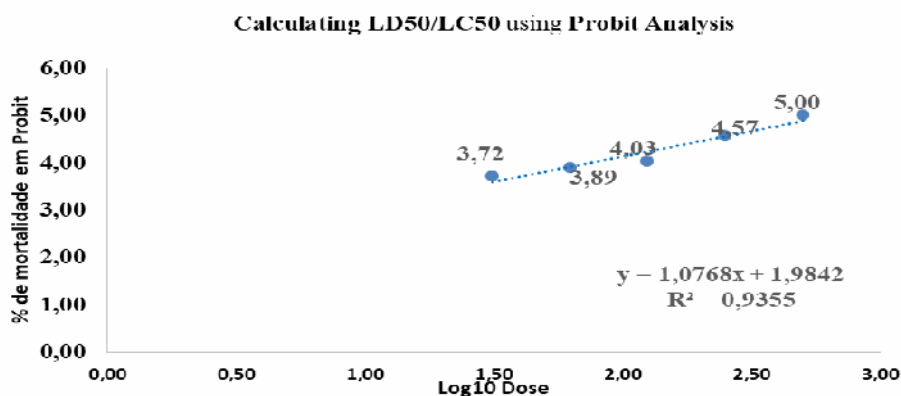
**FIGURA 2.** Porcentagem da mortalidade da *Artemia salina* do extrato etanólico das folhas do alho (*Allium sativum* L.) utilizando programa do Probit.



Os testes de toxicidades dos extratos etanólicos dos bulbos de alho para à *Artemia salina* estão mostrados na Tabela 4 e na Figura 3.

**TABELA 4.** Resultado do teste toxicidade do extrato etanólico do bulbo de alho da *Artêmia salina*.

Concentração (ppm)	Total de larvas	Larvas mortas	% mortalidade	DL <sub>50</sub> (ppm)
500	30	30	100	39,355
250	30	30	100	
125	30	24	80	
62,5	30	17	56,7	
31,2	30	14	46,7	
Controle	30	0	0	



**FIGURA 3.** Porcentagem da mortalidade da *Artemia salina* do extrato etanólico dos bulbos de alho (*Allium sativum* L.) utilizando programa do Probit.

A dose letal DL<sub>50</sub> do bulbo de alho apresentou-se 631,255 ppm e as folhas mostraram 39,355 ppm. O menor DL<sub>50</sub> foi considerando como maiores toxicidades enquanto maior DL<sub>50</sub> é considera como menor toxicidade (Figuras 2 e 3). Dentro deste teste, verificou-se que as toxicidades dos extratos etanólico do bulbo e das folhas da espécie *Allium sativum* L. apresentaram-se resultados e satisfatórios.

Substâncias que podem apresentar toxicidade variam amplamente tanto em relação à estrutura como em propriedades químicas. Segundo Bednarczuk et al. (2010) a *Artêmia salina* é bastante utilizada em ensaios toxicológicos por serem de fácil manuseio, baixo custo, fácil cultivo e obtenção. Os ensaios toxicológicos foram analisados pela dose letal mediana (DL<sub>50</sub>).

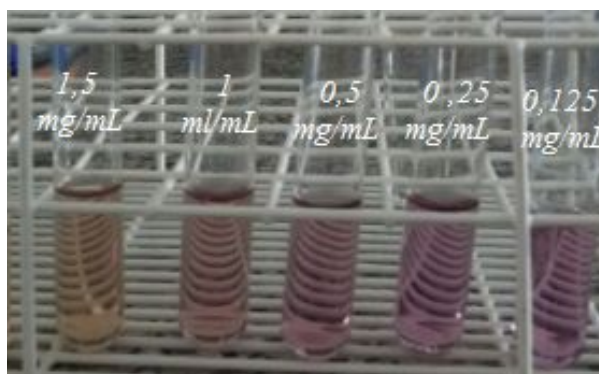
Na análise uma menor DL<sub>50</sub> apresenta toxicidade, enquanto maior DL<sub>50</sub> apresenta menos toxicidade, como mostrado nas Tabelas 3 e 4 e nas Figuras 2 e 3. Assim, o extrato etanólico dos bulbos alho apresentou-se mais tóxico do que das folhas. Baseado nos resultados da porcentagem da mortalidade da *Artemia salina*, calculado pelo programa Probit Analisis. Esse resultado segue o critério adotado por Meyer et al. (1982) que quando o resultado apresenta 30% abaixo disso é mais tóxico e entre 30% a 50%, toxicidade moderada, e acima de 50% é considerado de baixa toxicidade. Então, se comprova que através do teste *Artemia salina* percebeu-se que o bulbo tem mais toxicidade e as folhas do alho baixa toxicidade.

### Avaliação de potencial antioxidante

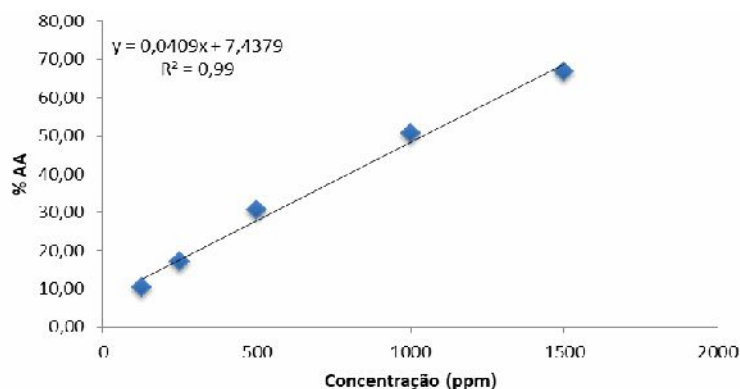
Os resultados obtidos no teste antioxidante do extrato etanólico das folhas é apresentado na Tabela 5 e na Figura 4. Verificaram-se as quantidades do extrato e frações da planta testada foram necessários para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% (IC<sub>50</sub>) conforme Figura 5.

**TABELA 5.** Avaliação potencial antioxidante do extrato etanólico das folhas do alho.

Concentração (ppm)	X (ppm)	Abs. y	z	Abs.total	%AA	r	IC <sub>50</sub>
1500	0,235	0,236 0,00	0,238	0,236	66,68	±	1.041,6
1000	0,306	0,376 0,04	0,371	0,351	50,49	±	
500	0,490	0,495 0,00	0,492	0,492	30,56	±	
250	0,585	0,588 0,00	0,589	0,587	17,16	±	
125	0,633	0,637 0,00	0,639	0,636	10,25	±	
DPPH	0,709	0,709 0,00	0,709	0,709	0	±	



**FIGURA 4.** Avaliação Potencial Atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas do *Allium sativum* L. avaliado pelo método de DPPH.



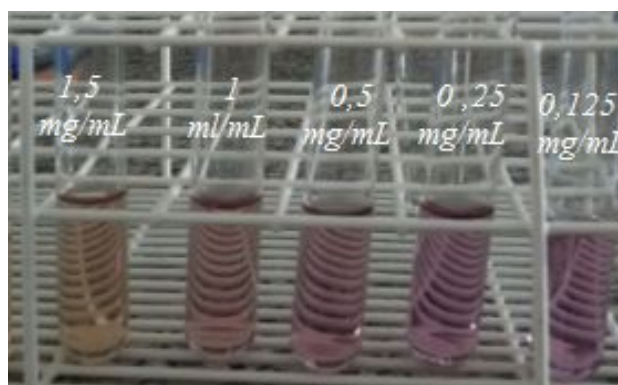
**FIGURA 5.** Porcentagem da inibição de Radical Livre DPPH do extrato etanólico das folhas de (*Allium sativum* L.)

Os resultados obtidos no teste antioxidante do extrato etanólico dos bulbos de alho está ilustrado na Tabela 6 e na Figura 6. Observou-se que as quantidades do extrato e frações dos bulbos testados foram necessárias para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% (CI<sub>50</sub>) mostrado na Figura 7.

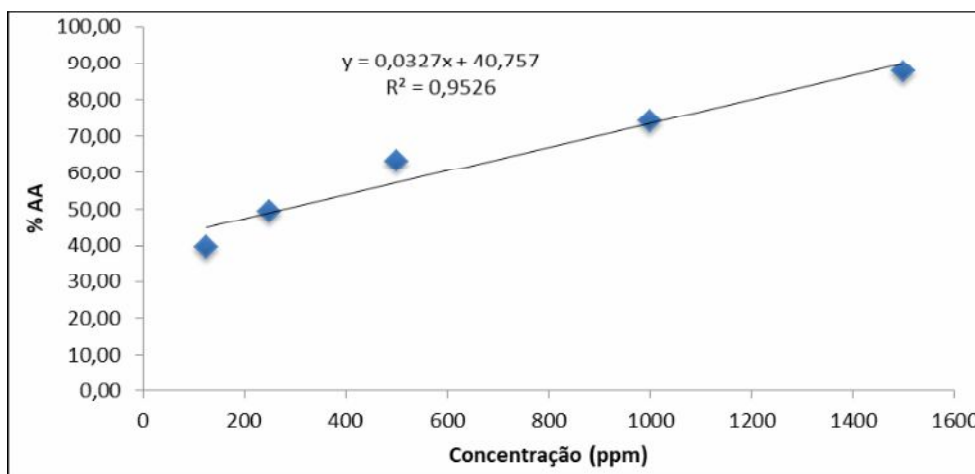
Observou-se também mudança de coloração nas Figuras 4 e 6. A capacidade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH foi estatisticamente comparável ao ácido ascórbico (Figuras 7 e 5), o que denota o potencial antioxidante desta fração.

**TABELA 6.** Avaliação potencial antioxidante do extrato etanólico dos bulbos do alho.

Concentração (ppm)	x	Abs. y	z	Abs. total	%AA	r	IC <sub>50</sub> (ppm)
1500	0,052	0,050	0,054	0,054 0,00	87,65	±	282,6
1000	0,108	0,109	0,110	0,109 0,00	74,11	±	
500	0,153	0,155	0,157	0,155 0,00	63,18	±	
250	0,210	0,213	0,215	0,113 0,00	49,48	±	
125	0,251	0,256	0,255	0,254 0,00	39,67	±	
DPPH	0,421	0,421	0,421	0,421 0,00	0	±	



**FIGURA 6.** Avaliação do Potencial de Atividade antioxidante do extrato etanólico dos bulbos de alho avaliado pelo método de DPPH.



**FIGURA 7.** Porcentagem da inibição de Radical Livre DPPH do extrato etanólico dos bulbos de alho (*Allium sativum* L.)

A partir da análise dos resultados obtidos, o extrato etanólico das folhas de alho frente ao radical DPPH, após 30 minutos de contato com a solução, observou-se a uma mudança na coloração da solução, de roxa passando a ficar amarela, e houve um decréscimo na medida da absorbância do DPPH, apresentado no espectro na região de 520 nm. Observou-se que, na concentração apresentou-se a porcentagem das folhas do alho com inibitória de 66,677 %, e a porcentagem do alho com inibitório de 87,648 %.

O IC<sub>50</sub> foi calculado a partir da curva de regressão linear e equação da reta. O IC<sub>50</sub> representa a concentração do extrato necessária para inibir 50% do radical DPPH, no extrato etanólico das folhas apresentou seu IC<sub>50</sub> (1.041,6 ppm), e o extrato etanólico do bulbo de alho apresentou o IC<sub>50</sub> (282,6 ppm) (BOROSKI et al., 2015).

Através do cálculo dos resultados da porcentagem da avaliação de potencial antioxidante é possível se utilizar do estudo da obtenção de novos fármacos com o objetivo de avaliar os compostos e fazer uma associação de outras atividades biológicas.

#### **Avaliação de frente a enzima acetilcolinesterase**

Após normalização dos dados foi realizado teste de curva de regressão não linear obtendo os seguintes resultados, conforme Tabela 7. Observou-se na Tabela 7, que avaliação frente à enzima acetilcolinesterase, o extrato das folhas de alho em relação ao bulbo foi superior em 2,06% para o R<sup>2</sup>. Os dados de extrato das folhas de alho tiveram um ajustamento ao modelo de regressão 99%, enquanto o extrato de bulbo foi 97%.

**TABELA 7.** Curva de regressão não linear pelo programa estatístico GraphPad Prism v5.01.

<b>Amostras</b>	<b>IC<sub>50</sub></b>	<b>Erro Padrão</b>	<b>R<sup>2</sup></b>
Padrão	1,15	0,05	0,99
Ext. EtOH Bulbo Alho	34,80	0,04	0,97
Ext. EtOH Folha Alho	29,28	0,44	0,99

## CONCLUSÃO

A análise fitoquímica qualitativa aponta a presença de metabólitos secundários como a cumarinas, esteroides, terpenoides e alcaloides no extrato etanólico das folhas do alho.

A avaliação antioxidante do extrato etanólico das folhas e dos bulbos do alho mostra-se moderada atividade nas folhas e nos bulbos apresenta uma maior atividade.

O ensaio dos náuplios da *artemia salina* na avaliação de toxicidade dos bulbos e das folhas manifestam resultados consideráveis. As folhas demonstram-se baixas toxicidades e nos bulbos expõem maiores toxicidades. Assim, o extrato etanólico dos bulbos do alho apresenta-se mais tóxico do que das folhas.

A ausência de toxicidade estimula a realização de estudos adicionais na atividade biológica para a determinação de propriedades biológicas e terapêuticas desta espécie.

## REFERÊNCIAS

ALVES, T M.A.; SILVA, A.F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.S.M.; SMÂNIA, E.F.A.; SMÂNIA JR., A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n. 3, p.367-373, 2000. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/mioc/v95n3/3884.pdf>>.DOI:<http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762000000300012>.

BAYAN, L.; KOULIVAND, P. H.; GORJI, A. Garlic: a review of potential therapeutic effects. **Avicenna Journal of Phytomedicine**, v. 4, n. 1, p. 1-14, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4103721/>>.

BEDNARCZUK, V. O.; VERDAM, M. C. S.; MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. Testes in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.44, 2010. Disponível em: <<https://revistas.ufpr.br/academica/article/view/21366/14087>>. DOI: <http://dx.doi.org/10.5380/acd.v11i2.21366>.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J.V.; COTTICA, S.M.; MORAIS, D.R. **Antioxidantes: Princípios e Métodos Analíticas**. Editora; Appris. 1ª Ed. Curitiba – PR, 2015.

BUENO, A. C; PIOVEZAN, M. **Bioensaio toxicológico utilizando Artemia salina: fatores envolvidos em sua eficácia**. Santa Catarina, 2015. Disponível em: <<http://docente.ifsc.edu.br/michael.nunes/MaterialDidatico/Analises%20Quimicas/TC%20II/TCC%202015%20/Ariele.pdf>>.

CASTRO, D. L. L. **Aspectos toxicológicos das plantas medicinais utilizadas no Brasil: um enfoque qualitativo no distrito federal**. Brasília: UNB, 2006.

CARRERA, G. C.; BENEDITO, E. F.; SOUZA-LEAL, T.; PEDROSO-DE-MORAES, C.; GASPI, F. O. G. Testes fitoquímicos em extratos foliares de *Oeceoclades maculata Lindl.* (Orchidaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.16, n.4, p.938-944, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n4/a20v16n4.pdf>>.

CUNHA, A. L.; MOURA, K. S.; BARBOSA, J. C.; SANTOS, A. F. Os metabólitos secundários e sua importância para o organismo. **Diversitas Journal**, n.1, n. 2, p.175-181, 2016. Disponível em: <[http://periodicos.ifal.edu.br/index.php/diversitas\\_journal/article/viewFile/332/326](http://periodicos.ifal.edu.br/index.php/diversitas_journal/article/viewFile/332/326)>. DOI: 10.17648/diversitas-journal-v1i2.332.

DALONSO, N.; IGNOWSKI, E.; MONTEIRO, C. M. A.; GELSLEICHTER, M.; WAGNER, T. M.; SILVEIRA, M. L. L.; SILVA, D. A. K. Extração e caracterização de carboidratos presentes no alho (*Allium sativum* L.): proposta de metodologia alternativa. **Ciência Tecnologia Alimentos**, n. 29, v.4 p. 793-797, 2009. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v29n4/14.pdf>>. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612009000400014>.

DOMINGO, V.; ARTEAGA, J. F.; MORAL, J. F. Q.; BARRERO, A.F. Unusually cyclized triterpenes: occurrence, biosynthesis and chemical synthesis. **Natural Product Reports**, v. 26, p. 115-134, 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n1p26-30>

ELLMAN G. L., COURTNEY K. D., ANDRES V. JR., AND FEATH-ERSTONE R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. **Pharmacology Biochemistry** V.7, p.88-95, 1961. Disponível: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0006295261901459>>. DOI: [https://doi.org/10.1016/0006-2952\(61\)90145-9](https://doi.org/10.1016/0006-2952(61)90145-9)

FONSECA, G.M.; PASSOS, T.C.; NINAHUAMAN, M.F.M.L.; CAROCI, A.S.; COSTA, L.S. Avaliação da atividade antimicrobiana do alho (*Allium sativum* Liliaceae) e de seu extrato aquoso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.3, p.679-684, 2014. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v16n3s1/07.pdf>>.

LIMA NETO, G.A.; KAFFASHI, S.; LUIZ, W.T.; FERREIRA, W.R.; DIAS DA SILVA, Y.S.A.; PAZIN, G.V.; VIOLANTE, I.M.P. Quantificação de metabólitos secundários e avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de algumas plantas selecionadas do Cerrado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.1069-1077, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n4s3/1516-0572-rbpm-17-4-s3-1069.pdf>>.

LOZANO, A. F. Q.; BAGNE, L.; RORA, D. C. B. Uma abordagem dos efeitos terapêuticos do *Allium sativum* (alho) no sistema imunológico. **Revista Científica da FHO|UNIRARAS**, v. 3, n.1, p. 1-5, 2015. Disponível em: <[http://www.uniararas.br/revistacientifica/\\_documentos/art.3-009-2015.pdf](http://www.uniararas.br/revistacientifica/_documentos/art.3-009-2015.pdf)>.

MAJEWSKI, M. *Allium sativum*: facts and myths regarding human health. **Rocz Panstw Zakl Hig**, n. 2, v. 65, n. 1, p. 1-8, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24964572>>.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. E.; LAUGHLIN, J. L. Brine Shrimp: A Convenient General Bioassay for Active Plant Constituents. **Planta Médica**, v.45, n.1, p.31-34, 1982. Disponível: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17396775>>. DOI: 10.1055 / s-2007-971236

OLIVEIRA, A. P. G.; OLIVEIRA, A. F. M.; VIEIRA, B. C. R.; SOUZA, M. H.; AMARAL, A. A. Alho (*Allium sativum* Linn.) como fitoterápico para animais de produção. **Enciclopédia Biosfera**, v.11, n.22, p. 46-61, 2015. Disponível em: <<http://www.conhecer.org.br/enciclop/2015E/alho.pdf>>.

OLIVEIRA, N. T.; ALMEIDA, S. S. M. S. Análise fitoquímica, citotóxica e antimicrobiana do extrato bruto etanólico das folhas da espécie *Ambelania acida Aublet* (Apocynaceae). **Biota Amazônia**, 2016. Disponível em: <<https://periodicos.unifap.br/index.php/biota/article/view/1525/v6n1p20-25.pdf>> DOI: <http://dx.doi.org/10.18561/2179-5746/biotaamazonia.v6n1p20-25>.

ORLANDA, J. F. F.; VALE, V. V. Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.730-736, 2015. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n4s1/1516-0572-rbpm-17-4-s1-0730.pdf>>. DOI: [http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/14\\_012](http://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/14_012).

PAULA, C. S; VENDAM, M. C. S. et al., Caracterização fitoquímica, toxicidade e avaliação preliminar da atividade antibacteriana das folhas de *Bauhinia unguolata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, V.96, n.2, p.1315 – 1334, 2015. Disponível em: <<http://www.rbfarma.org.br/files/RBFARMA-Vol-96---Numero-2.pdf> >

PINTO. C. A.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO. R. A. Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas. **Química Nova**, v. 25, 45-61, 2002. Disponível: <<http://www.scielo.br/pdf/qn/v25s1/9413.pdf>>.

ROSA, C. S.; VERAS, K. S.; SILVA, P. R.; LOPES N. J. J.; CARDOSO, H. L. M.; ALVES, L. P. L.; BRITO, M. C. A.; AMARAL, F. M. M.; MAIA, J. G. S.; MONTEIRO, O. S.; MORAES, D. F. C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. *Artemia salian* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.18, n.1, p. 19-29, 2016. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v18n1/1516-0572-rbpm-18-1-0019.pdf>>.

SCIO, E. Cumarinas encontradas no gênero Kielmeyera - Família Clusiaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.85, n.1, p.27-31, 2004. Disponível em: <[http://rbfarma.org.br/files/pag\\_27a31.pdf](http://rbfarma.org.br/files/pag_27a31.pdf)>.

SILVA, A. C. O.; LIMA, R. A. Identificação das classes de metabólitos secundários no extrato etanólico dos frutos e folhas de *Eugenia uniflora* L. **REGET**, v. 20, n. 1, p. 381-388, 2016. Disponível em: <<https://periodicos.ufsm.br/reget/article/view/19537/pdf>>.

TOMCZAM, M. REICHERT, S. **Estudo Fitoquímicos Adicionais com as Folhas e Cascas de *Alleurites molucana* L. (Euphorbiaceae)**. Itajaí (SC), 2013.

VISHWAKARMA, S.; CHANDAN, K.; JEBA, R. C.; KHUSHBU, S. Comparative study of qualitative phytochemical screening and antioxidant activity of *Mentha arvensis*, *Elettaria cardamomum* and *Allium porrum*. **Indo American Journal of Pharmaceutical Research**. V. 4, n.5, 2014. Disponível em:

<[https://www.researchgate.net/publication/277667528\\_Comparative\\_study\\_of\\_Qualitative\\_Phytochemical\\_screening\\_and\\_antioxidant\\_activity\\_of\\_Mentha\\_arvensisElettaria\\_cardamomum\\_and\\_Allium\\_Porrum](https://www.researchgate.net/publication/277667528_Comparative_study_of_Qualitative_Phytochemical_screening_and_antioxidant_activity_of_Mentha_arvensisElettaria_cardamomum_and_Allium_Porrum)>

WHO, **Guidelines for efficacy testing of insecticides for indoor and outdoor ground-applied space spray applications**. Geneva, 23-27 February 2009. Geneva, World Health Organization, 2009 (WHO/HTM/NTD/WHOPES/2009.2).