

dards in a public group practice in Sweden. *Swed Dent J*, v. 25, n. 4, p. 137-44, apr. 2001.

SCARPARO A.; ZERMIANI T.C.; DITTERICH R.G.; PINTO M.H.B. Impacto da Política Nacional de Saúde Bucal – Programa Brasil Sorridente – sobre a provisão de serviços odontológicos no Estado do Rio de Janeiro. *Cad. Saúde Colet.*, Rio de Janeiro, v.23, n.4, p. 409-415, 2015.

SHAW, WC. ET AL. Quality control in orthodontics: indices of treatment need and **treatment standards**. *Br. Dent. J.* London, v.170, n.3, p.107-112, 1991.

SHEIHAM, A. A determinação de necessidades de tratamento odontológico: uma abordagem social. In: PINTO, V. G. *Saúde bucal coletiva*. São Paulo: Santos, 2000, p. 223-50.

SILVEIRA, Marise Fagundes; FREIRE, Rafael Silveira; NEPOMUCENO, Marcela Oliveira; MARTINS, Andrea Maria Eleutério de Barros Lima; MARCOPITO, Luiz Francisco. Gravidade da maloclusão em adolescentes: estudo de base populacional no norte de Minas Gerais, Brasil. *Revista de Saúde Pública*, v.50, 2016.

SOUSA, Jossaria Pereira de; SOUSA, Simone Alves de. Prevalência de má oclusão em escolares de 7 a 9 anos de idade do Polo 1 da Rede Municipal de Ensino em João Pessoa-PB. *Revista de Odontologia da UNESP*, v.42, n.2, p.117, abr 2013.

VAN DER LINDEM, F.P.G.M. Genetic and environmental factors in dentofacial morphology. *Am J Orthod*. v.52, n. 8, p. 576-583, 1966.

VIANNA, M. L. W. **A americanização (perversa) da seguridade social no Brasil**. Rio de Janeiro: Revan, 2000.

WATANABE, M. G. C.; AGOSTINHO, A. M.; MOREIRA, A. Aspectos socioeconômicos dos

pacientes atendidos nas clínicas da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto/USP. *Rev Odontol Univ São Paulo*, v. 11, n. 2, p. 147-51, abr./jun.1997.

---

---

# Comunicação Breve

---

---

# PESQUISA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DO *ALLIUM SATIVUM L.* PELO ENSAIO QUÍMICO DO DPPH E ENSAIOS *EX VIVO* COM NEUTRÓFILOS HUMANOS

FUZZATTI, Sâmela C. – Egressa do curso de Biomedicina da Universidade de Araraquara – UNIARA ; CRUZ, Andreza Furquim.; GILENO, Miriane da Costa\*. - Docentes do curso de Farmácia e Biomedicina da Universidade de Araraquara – UNIARA

\*Autor para correspondência e-mail: mcostagileno@yahoo.com.br

Recebido em: 17/08/2017  
Aprovação final em: 05/12/2017

## RESUMO

O *Allium sativum L.* detém diversos efeitos biológicos como ação antioxidante, antitrombótica, antifúngica e antibacteriana. Devido às suas atividades terapêuticas, consta na relação de plantas medicinais recomendadas pela ANVISA. Este trabalho objetivou avaliar a ação do *Allium sativum L.*, alho, sobre funções de neutrófilos humanos, inclusive citotoxicidade e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) e a pesquisa da atividade antioxidante pelo ensaio químico do DPPH. Durante 72 horas, o alho permaneceu em contato com etanol absoluto e após filtração, diferentes diluições foram preparadas para realização dos ensaios. Realizou-se estudos das propriedades antioxidantes do alho por meio de ensaio com DPPH, teste de viabilidade celular (Azul de Trypan), formação de radical ânion superóxido pelo Teste do Nitro Azul de Tetrazólio (NBT), o efeito no sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (ensaio com TMB). No experimento realizado com DPPH demonstrou-se o efeito antioxidante do extrato de alho em todas as concentrações estudadas. A avaliação estatística do efeito do alho no sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, através do ensaio com TMB, permitiu demonstrar que o *Allium sativum L.* não inibiu a ação da mieloperoxidase, produzida normalmente, pelos neutrófilos. Desta forma, conclui-se que o extrato de alho demonstrou atividade antioxidante pelo ensaio do DPPH e NBT, inibindo também a produção de radical ânion superóxido, não prejudicou a viabilidade dos neutrófilos humanos e não é inibidor de mieloperoxidase. Outros experimentos são necessários para investigar a ação do extrato de alho sobre a atividade fagocitária dos neutrófilos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Alho; Neutrófilos; Antioxidante.

## RESEARCH OF THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF *ALLIUM SATIVUM L.* BY THE CHEMICAL DPPH ASSAY AND *EX VIVO* ASSAYS WITH HUMAN NEUTROPHILS

### ABSTRACT

*Allium sativum L.* has several biological effects such as antioxidant, antithrombotic, antifungal and antibacterial action. Due to its therapeutic activities, it is included in the list of medicinal plants recommended by ANVISA. This work aimed to evaluate the action of *Allium sativum L.*, garlic, on human neutrophil functions, including cytotoxicity and production of reactive oxygen species (ROS) and the research of antioxidant activity by the DPPH chemical assay. For 72 hours, the garlic remained in contact with absolute ethanol and after filtration, different dilutions were prepared for the tests. Studies on the antioxidant properties of garlic were carried out by DPPH assay, cell viability test (Trypan Blue), superoxide anion radical formation by the Tetrazolium Nitrite Blue Test (NBT), the effect on the MPO / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system ( TMB assay). In the experiment performed with DPPH the antioxidant effect of the garlic extract was demonstrated in all concentrations studied. The statistical evaluation of the effect of garlic

*Pesquisa da atividade antioxidante do Allium Sativum L. ...*

on the MPO / H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> system, through the TMB assay, showed that *Allium sativum L.* did not inhibit the action of normally produced myeloperoxidase by neutrophils. Thus, it was concluded that garlic extract showed antioxidant activity by the DPPH and NBT assay, also inhibiting superoxide anion radical production, did not impair the viability of human neutrophils and is not a myeloperoxidase inhibitor. Further experiments are needed to investigate the action of garlic extract on the phagocytic activity of neutrophils.

**KEYWORDS:** Garlic; Neutrophils; Antioxidant.

### INTRODUÇÃO

A espécie *Allium sativum L.* é conhecida popularmente como alho e pertence à família Liliaceae. Originário provavelmente da Ásia Central, o alho é atualmente cultivado em vários países, inclusive no Brasil e apresenta grande importância econômica por ser amplamente utilizado pela população na preparação de alimentos (KLASSA et al., 2013, p. 558). O poder terapêutico do alho é reconhecido pelo Ministério da Saúde (MARCHIORI, 2014), e a espécie consta na relação das plantas medicinais recomendadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da resolução RDC nº. 17 de 24 de fevereiro de 2000.

De acordo com a taxonomia, há cerca de quatro variedades botânicas de *Allium sativum L.*: *A. sativum L.* variedade *sativum*, que corresponde ao alho comum; *A. sativum L.* variedade *ophioscorodon*; *A. sativum L.* variedade *pekinense* e *A. sativum L.* variedade *nipponicum* (HOOGERHEIDE, 2009, p. 17). Acredita-se que a partir das duas sub-espécies, *ophioscorodon* e *sativum*, provêm oito variedades: *Asiatic*, *Creole*, *Purple Stripe*, *Marbled Purple Stripe*, *Porcelain* e *Rocambole* proveniente de *ophioscorodon* e do tipo *sativum*, *Artichoke* e *Silverskin* (GRASSI, 2014). Existem ainda outras espécies do gênero *Allium* descritas na obra de Lorenzi e Matos (2002, p. 312), que também são utilizadas como condimento de alimentos, porém em menor escala: alho-da-terra (*A. schenoprasum*

*L.*), cebolinha-de-cheiro (*A. fistulosum L.*) e alho-porro (*A. porrum L.*).

Em 1958, Pasteur identificou no alho uma atividade antibiótica (SOUZA, 2010, p.3) que, ao ser reconhecida a partir de observações em uma placa de Petri, permitiu classificá-lo como um agente bactericida (MARCHIORI, 2014).

O consumo reduzido do alho, restringi-o a uma pequena importância nutricional. Apesar de ser consumido em pequenas quantidades, o alho possui em sua composição uma diversidade de compostos bioativos, destacando-se os organossulfurados, fenólicos e fitosteróis (QUEIROZ, 2010, p. 31). Além desses compostos, encontra-se no alho, adenosina, pectinas, saponinas esteroides. Dentre os compostos fenólicos, encontram-se flavonoides tais como a quercetina, apigenina e miricetina, e, também, mucilagens (MARCHIORI, 2010; QUEIROZ, 2010, p. 34).

Muitos estudos demonstram propriedades antioxidantes do gênero *Allium*, atribuídas à presença de organossulfurados e seus derivados. A partir do extrato de alho, são obtidas duas classes principais de componentes antioxidantes: os flavonóides e os compostos que contêm enxofre, dialil sulfeto e trissulfeto e alil-cisteína. Há estudos que demonstram na alicina (dialil tiosulfonato), em baixas concentrações, atividades antioxidantes (SILVA, 2009, p. 40). O alho eleva a capacidade total antioxidante do organismo através de um mecanismo mediado pelo óxido nítrico. A alicina, estruturalmente semelhante ao dimetilssulfeto, tem capacidade de remover radicais livres, efeito este também proporcionado pela presença do selênio na composição. A ação antioxidante da aliina, alcina e ajoeno inibem a peroxidação lipídica, inibindo a enzima xantina-oxidase e eicosanóides, demonstrando o efeito do alho sobre a LDL (Lipoproteína de baixa densidade) (MARCHIORI, 2014).

Atualmente, já foram identificados cerca de 30 componentes do alho que possuem efeitos terapêuticos. Algumas dessas propriedades farmacológicas estão bem estabelecidas: ação

antibacteriana e antioxidante, efeitos anti-helmínticos, anti-neoplásicos e imunológicos, combate a patologias endócrinas, cardiovasculares (APOLINÁRIO *et al.*, 2008, p. 2); ações fibrinolítica, anticoagulante e anti-hipertensiva, natriurético e diurético, estimulante da secreção de insulina e ação hipoglicêmica, ação hipolipidêmica, além de prevenção da aterosclerose (KLASSA, 2013, p. 558). Cientificamente, alguns estudos demonstraram ainda compostos com ação terapêutica no tratamento de desconfortos gastrintestinais, dislipidemias, diabetes, atividades anti-inflamatória e antiasmática (MARCHIORI, 2014; KISS, et al, 2006; KLASSA, et al. 2013).

O alho também é capaz de reduzir o colesterol, aumentar a resistência física e estimular secreções de glândulas digestivas e da vesícula biliar (HOOGGERHEIDE, 2009, p. 17). “Desde perturbações do aparelho digestivo, verminoses e parasitoses intestinais, edema, gripe, trombose, aterosclerose, até infecções da pele e das mucosas” (LORENZI, MATOS, 2002, p. 312).

Neutrófilos ou leucócitos polimorfonucleares (PMN) são células sanguíneas produzidas e armazenadas na medula óssea. São as primeiras células a serem recrutadas em um processo inflamatório e utilizam-se de múltiplos mecanismos para eliminar microrganismos patogênicos (KOLACZKOWSKA; KUBES, 2013). Fatores estimuladores de colônias de granulócitos (G-CSF) e outros mediadores estimulam as células hematopoiéticas pluripotentes, na medula óssea, ocorrendo a produção dos neutrófilos, que representam de 50% a 70% do número de leucócitos total, sendo que, a cada minuto são lançados cerca de dez milhões de neutrófilos na corrente sanguínea de um homem adulto (PEDROSA, 2013, p.32-33).

A principal função dos neutrófilos é a fagocitose, processo que lhes confere considerável importância na defesa do hospedeiro contra microrganismos invasores e partículas estranhas por fagocitose na resposta imune inata (URBACZEK, 2008, p.31; OLIVEIRA, 2012, p.22). Este mecanismo torna-se eficaz com o aumento da produção de substâncias

oxidativas internamente, ocorrendo devido ao aumento da atividade respiratória destas células (PEIXOTO *et al.*, 2002, p.17).

Seja por estímulos fagocíticos ou por ação de mediadores inflamatórios, o consumo de oxigênio das células neutrofílicas é aumentado e o processo de “explosão respiratória” é manifesto (SANTOS, 2007, p.4).

O processo de fosforilação oxidativa consiste na redução do oxigênio em água. Na redução completa do oxigênio à água, são necessários quatro elétrons, obtendo-se a produção de produtos de redução: ânion superóxido ( $O_2^-$ ), o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e o radical hidroxil ( $HO\cdot$ ), que em conjunto compõem as Espécies Reativas de Oxigênio. “As EROs podem reagir com biomoléculas tais como proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos, sendo capazes de provocar danos oxidativos nestas estruturas” (KVICINSKI, 2007, p.24). A investigação de materiais naturais como fontes de novos agentes terapêuticos é de grande interesse científico e social. Por isso, o entendimento da ação do *Allium sativum L.* sobre a função de uma importante célula do sistema imune é muito importante.

#### OBJETIVOS

O objetivo deste trabalho foi avaliar a ação do extrato etanólico do *Allium sativum L.* sobre a função de neutrófilos humanos e pesquisar a atividade antioxidante por ensaio químico. Foram realizados:

- Ensaio de citotoxicidade pelo Azul de Trypan;
- Pesquisa da atividade da mieloperoxidase pelo ensaio com tetrametilbenzidina (TMB);
- Pesquisa da atividade da NADPH oxidase da membrana pela formação do radical ânion superóxido (teste do NBT);
- Pesquisa da ação antioxidante pelo teste do DPPH.

#### MATERIAL E MÉTODOS

Substância teste:

O alho (*Allium sativum L.*) foi comprado

em comércio local. Primeiramente, o alho foi descascado e esmagado e deixado em contato com etanol absoluto durante 72 horas, para melhor extração de seus constituintes. Em seguida, este extrato foi filtrado em papel filtro e algodão, e um extrato concentrado foi obtido (0,5 g/mL), a partir deste, diferentes concentrações do extrato de alho foram estudadas (0,006, 0,03, 0,04, 0,05, 0,06 e 0,012 g/ml – concentrações determinadas com base na quantidade inicial de alho empregado para a extração) diluídas em tampão PBS.

Solução de 3, 3', 5, 5'- tetrametilbenzidina (TMB), 1.6 mM

0,024g de TMB foram dissolvidas em 5 mL de dimetilformamida (DMF), em seguida adicionou-se 100 µL de uma solução de iodeto de potássio 10 mM e o volume foi completado para 10 mL com ácido acético glacial 800mM. A solução foi preparada no dia de uso e mantida em frasco âmbar.

Separação de neutrófilos humanos utilizando gelatina (COSTA, 1991)

Para separação das células mononucleares e polimorfonucleares (PMN), o sangue humano foi coletado com ácido etilenodiaminoacético dipotássico ( $K_2$ -EDTA) ou heparina e centrifugado a 2500 rpm durante 10 minutos e, em seguida, foi retirado o plasma e o volume celular foi reconstituído com PBS. Adicionou-se uma solução mantida à 37°C de gelatina 2% em NaCl 0,15 M (v/v), sobre a suspensão de células sanguíneas reconstituída com PBS; o material foi homogeneizado e incubado à 37°C por 30 minutos. Após a incubação, o sobrenadante rico em leucócitos foi retirado e transferido para outro tubo de centrífuga onde foi lavado três vezes com PBS durante 10 minutos a 1500 rpm. O sedimento final foi lavado 3 vezes em PBS. O sedimento foi ressuspenso em 1 mL de tampão PBS suplementado (10 mL de PBS mais 100 µL de solução de glicose (1mg/mL), 100 µL de solução de cloreto de magnésio (0,5 mM) e 100 µL de solução de cloreto de cálcio (1mM)), e as células foram contadas em câmara de Neubauer.

#### Viabilidade Celular: Teste de exclusão do

#### corante Azul de Trypan.

50 µL de suspensão de neutrófilos na concentração de  $1 \times 10^6$  células/mL em tampão PBS foram incubados por 60 e 90 minutos a 37°C na presença do extrato de alho em diferentes concentrações (0,06, 0,05, 0,04 e 0,03 g/mL). Como controle, a mesma quantidade de células foi incubada em tampão PBS na ausência do extrato. Após o período de incubação acrescentou-se 20 µL da solução de Azul de Trypan por 5 minutos, à temperatura ambiente, e um total de 100 células foram contadas nos quadrantes laterais da câmara de Neubauer. A porcentagem de células viáveis foi definida pela fórmula:

$$\text{Porcentagem de células viáveis} = \left[ \frac{\text{células vivas}}{(\text{células vivas} + \text{células mortas})} \right] \times 100$$

#### Avaliação do efeito do alho no sistema MPO/ $H_2O_2$

A avaliação do efeito do alho no sistema MPO/ $H_2O_2$  foi feita segundo Marques e Dunford (1997) utilizando tetrametilbenzidina (TMB) como substrato. Uma solução contendo tampão fosfato de potássio 80 mM pH 5.4, 200 µL de  $H_2O_2$  0.3 mM, 320µL de TMB 1.6 mM e diferentes concentrações do extrato de alho (0,006, 0,06 e 0,012 g/mL) foi incubada por 3 minutos a 37°C em espectrofotômetro. A reação foi disparada adicionando-se MPO (10µL) e a cinética de oxidação do TMB foi acompanhada por 300 segundos, observando-se o efeito do alho em diferentes concentrações nessa oxidação. As absorbâncias obtidas foram analisadas, fazendo-se as médias das concentrações utilizadas, em duplicatas.

A variação de absorbância por minuto ( $\Delta A_{652}/\text{min}$ ) e a atividade de mieloperoxidase em unidade internacional por mL (U/mL) de MPO foi calculada a partir da seguinte fórmula:

$$U/mL = \Delta A_{652} \text{ nm/min} \times 5.13$$

$$U/mL = (2 \times \Delta A_{652} \text{ nm/min} / 3.9 \times 10^4 \text{ M}^{-1}) \times (10^3 \text{ } \mu\text{mol/mmol} \times 1 \text{ mL} \times 1/10 \text{ } \mu\text{L} \times 1000 \text{ } \mu\text{L/mL})$$

A atividade da mieloperoxidase foi definida como a quantidade de enzima que consome 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  por minuto de reação.

#### Avaliação da capacidade sequestradora (ou redutora) de radical DPPH - Teste para avaliação do potencial antioxidante do *Allium sativum L*

O teste foi realizado de acordo com a metodologia apresentada por Fenglin et al. (2004) e Cheng et al. (2006). Resumidamente, foi utilizada uma solução de DPPH a 0,004% em metanol (MeOH). A cada 200  $\mu\text{L}$  da amostra teste (extrato de alho) em diferentes concentrações (0,6g/mL a 0,3g/mL de concentração final em EtOH) foram adicionados 400  $\mu\text{L}$  da solução de DPPH, sendo as absorvâncias determinadas a 516 nm em espectrofotômetro, após 30 minutos de reação a 25°C. Um controle de máxima absorção foi utilizado (solução de DPPH (400  $\mu\text{L}$ ) adicionadas de 200 $\mu\text{L}$  de EtOH). A equação a seguir foi utilizada para determinar a porcentagem de inibição (% $\Delta$ ), onde  $A_0$  representa a absorvância do DPPH sem a adição das amostras (extrato de alho) e  $A$  corresponde a absorvância obtida na presença das amostras, após 30 minutos de reação.

$$\% \Delta = \frac{A_0 - A}{A_0} \times 100$$

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e acompanhados dos antioxidantes controles: quercetina e trolox (análogo hidrossolúvel da vitamina E).

#### Teste do Nitro Azul de Tetrázolio (NBT)

Posteriormente à separação de neutrófilos, foram adicionados em tubos 80 $\mu\text{L}$  de PMN ( $1 \times 10^6$  células/mL), tampão PBS, 10 $\mu\text{L}$  de forbol miristato acetato (PMA) como estímulo a 0,1  $\mu\text{M}$  e extrato de alho, em diferentes concentrações finais: 0,06, 0,05, 0,04 e 0,03 g/mL (a partir da solução 0,5g/mL de etanol). Após incubação de 30 minutos em temperatura ambiente, foi adicionada aos tubos de reação a solução de 150  $\mu\text{L}$  nitrozol de tetrázolio (NBT) 1,22 mM e incubou-se por mais

30 minutos em temperatura ambiente (CIARLINI et al, 2005; OLIVEIRA et al, 2009). Prepararam-se também as soluções sem extrato de alho (controle negativo), para a comparação com os resultados obtidos. Após incubação confeccionou-se lâminas, obtendo-se uma camada monocelular de células. Para a coloração utilizou-se corante de rotina hematológica, May Grounwald-Giemsa. A leitura das lâminas foi feita em microscópio óptico em objetiva de imersão (100x), estabelecendo-se, qualitativamente, a presença de células positivas que apresentaram grânulos escuros de formazana no seu citoplasma (NBT reduzido pelo radical ânion superóxido).

#### Análise Estatística

Os resultados foram expressos como média e desvio padrão e comparados por análise de variância (Anova), seguido do pós-teste de Tukey, estabelecendo-se o nível mínimo de significância de  $p < 0,05$ . Todos os experimentos foram realizados em duplicata.

#### Comitê de Ética para ensaio com neutrófilos humanos

O protocolo foi submetido ao Comitê de Ética da UNIARA, autorizando a coleta de sangue e os experimentos (Parecer nº. 1.041.034/ 2015).

#### RESULTADOS E DISCUSSÃO

O tema abordado representa grande importância social, pois considerando o alho um alimento economicamente acessível e presente cotidianamente na alimentação da maior parte da população, retêm fitoquímicos terapêuticos (KLASSA, 2013). Uma classe destes fitoquímicos, os fenólicos, são produtos do metabolismo secundário das plantas. Dentre os fenólicos presentes no alho, estão os flavonóides quercetina, apigenina e miricetina, que são compostos com potencial antioxidante. Ainda, encontram-se os compostos organossulfurados e precursores, sendo a substância mais conhecida a alicina, que em conjunto com os fenólicos atribuem a propriedade antioxidante ao alho (QUEIROZ, 2010).

Para a análise da atividade do *Allium sativum L.* no organismo humano, considerou-se sua ação nas células sanguíneas, particularmente os neutrófilos, principais fagócitos e participantes da imunidade natural. Após estimulação, o neutrófilo produz um metabolismo oxidativo não mitocondrial, o *burst* oxidativo, caracterizado pela produção das espécies reativas de oxigênio (EROs), geradas por mecanismos dependentes ou independentes da MPO liberada dos grânulos citoplasmáticos (URBACZEK, 2008). Desta forma, no presente trabalho avaliou-se a ação do alho sobre a função de neutrófilos humanos, principalmente pela produção de EROs.

Os antioxidantes são substâncias capazes de diminuir ou inibir a atividade de substâncias oxidantes e radicais livres, que por sua vez levam a danos em biomoléculas como lipídios, ácidos graxos, aminoácidos e no DNA. No experimento realizado com DPPH demonstrou-se o efeito antioxidante do extrato de alho em todas as concentrações estudadas e os resultados foram semelhantes aos apresentados pela quercetina e pelo Trolox (Figura 1).

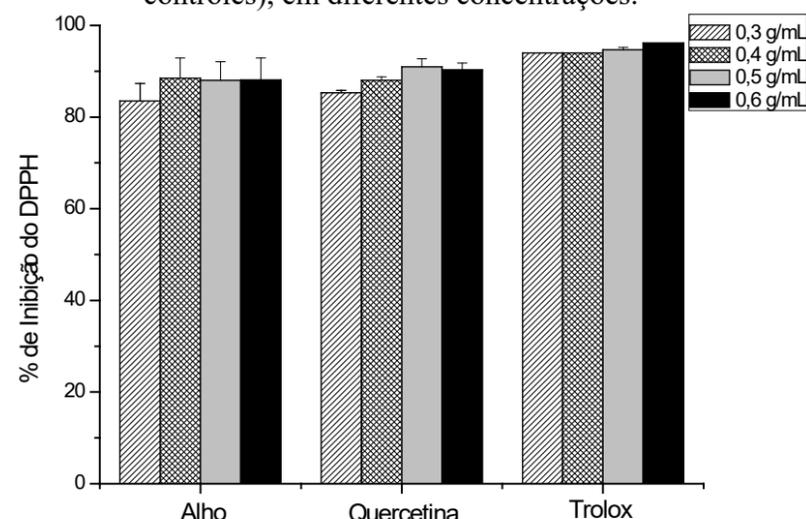
O efeito do extrato foi determinado sobre a NADPH-oxidase de membrana e sobre o seu produto, o radical ânion superóxido. O termo “burst” respiratório ou “burst” oxidativo, refere-se a uma série de eventos metabólicos que ocorrem quando os fagócitos são estimulados apropriadamente. Estes são: aumento de consumo de  $\text{O}_2$  e produção de espécies reativas de oxigênio (CHANOCK et al., 1994; SEGAL e ABO, 1993). O teste do nitrozol de tetrázolio (NBT) tem o objetivo de avaliar o mecanismo microbida de fagócitos avaliando sua habilidade em produzir EROs capazes de reduzir o NBT para a sua forma insolúvel (formazan), a qual é identificada sob microscopia óptica pela cor azul no citoplasma. A quantidade de NBT reduzida é diretamente proporcional à quantidade de ERO produzidas pelos fagócitos, sendo os principais agentes microbicidas produzidos por fagócitos. Lima (2011), baseando-se no estudo de compostos fenólicos totais, (em particular, os flavonóides), avaliou a capacidade antioxidante

de plantas, demonstrando que, os flavonóides foram capazes de sequestrar o radical ânion superóxido, levando à diminuição da velocidade de formação do formazan, a partir da redução do NBT pelo radical, demonstrando a presença de compostos antioxidantes. Durante a análise microscópica (Figuras 2A e 2B), pôde-se constatar uma diminuição nos grânulos de formazana quando comparamos o neutrófilo controle (Figura 2A) e o neutrófilo na presença do alho (Figura 2B), ou seja, substâncias antioxidantes presentes no alho, sequestraram o radical ânion superóxido, confirmando a atividade antioxidante do alho.

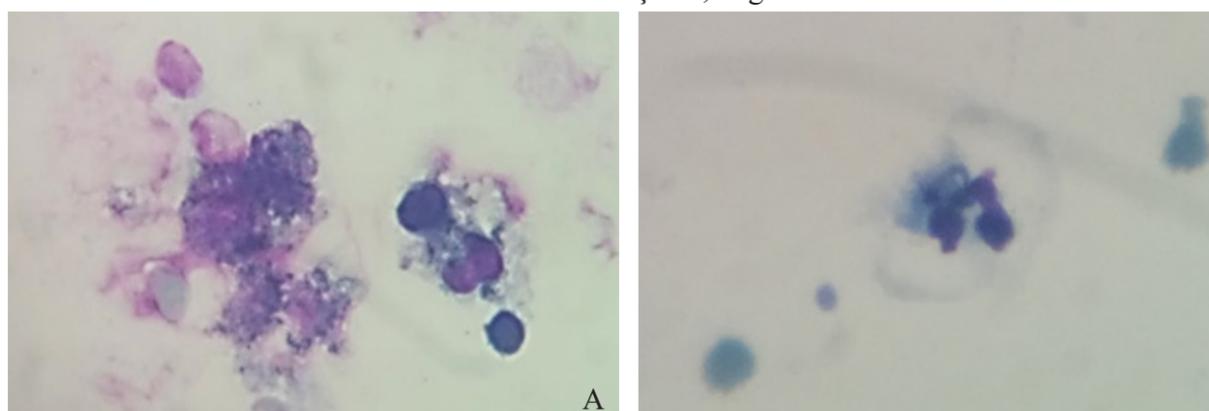
Durante o *burst* respiratório, na degranulação enzimática, a enzima mieloperoxidase (MPO) é capaz de catalisar uma variedade de compostos, inclusive atuar na peroxidação lipídica (SILVA, 2001). A MPO é o principal componente dos grânulos azurófilos dos neutrófilos e tem um papel muito importante no *burst* respiratório. Ao determinar a ação do extrato de alho sobre a mieloperoxidase (MPO) através de experimento com a TMB que é muito sensível (MARQUEZ e DUNFORD, 1998), ficou claro, que o mesmo não funciona como inibidor da MPO (Figura 3), sugerindo que o *Allium sativum L.* não interfere na atividade desta enzima e, como consequência, não interfere na eficiência de uma das vias do “burst” oxidativo dos neutrófilos, provavelmente, seu efeito deva ser mais em nível de membrana celular.

Em relação às concentrações de extrato etanólico de alho utilizadas nos testes realizados, observa-se uma diferença significativa em relação ao controle com a concentrações 0,006 g/mL, demonstrando que o alho teve efeito ativador sobre a mieloperoxidase neste estudo. No entanto são necessários outros estudos para comprovar este efeito, trabalhando com concentrações mais baixas e mais altas de extrato de alho, uma vez que se dobrando a concentração do extrato (0,012 g/mL) não se observou o mesmo efeito sobre a enzima. No entanto ficou evidente que nenhuma concentração do extrato é inibidora da enzima, não prejudicando assim a função desta enzima presente

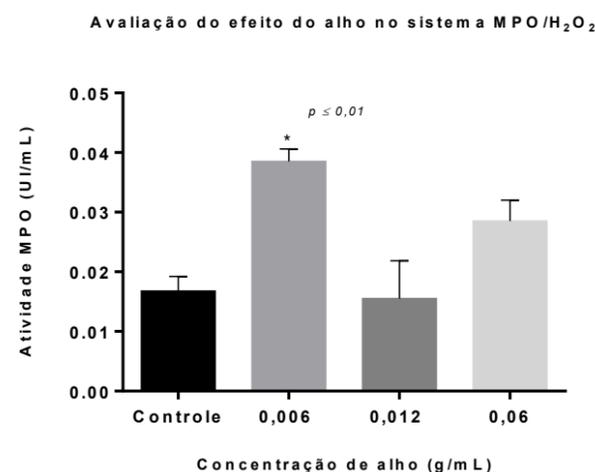
**Figura 1** - % de inibição do DPPH na presença do extrato de alho (teste), Quercetina e Trolox (antioxidantes controles), em diferentes concentrações.



**Figura 2** - Em A, grânulos de formazana sem alho (controle) sob estímulo de PMA. Em B, presença de grânulos de formazana no neutrófilo isolado (estimulado por PMA adicionado ao NBT), sob ação do alho em concentração 0,04 g/mL.



**Figura 3** - Avaliação do efeito do alho no sistema MPO/H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>



nos neutrófilos humanos.

Vários testes foram aplicados a fim de demonstrar possíveis efeitos, tanto benéficos quanto malefícios do alho sobre os neutrófilos, sendo um dos testes a inibição ou não de algumas funções das células. Para a observação da viabilidade celular, os neutrófilos foram analisados pela coloração Azul de Trypan. As células viáveis são impermeáveis ao corante, e por outro lado, as células não viáveis, devido à presença de poros em sua membrana, permitem a entrada de corante, e consequentemente à permeabilidade, coram-se em azul (CASTRO, 2015). Assim como

Shrivastava e Ganesh (2010), demonstraram a viabilidade celular pelo teste de exclusão do corante Azul de Trypan, na avaliação da citotoxicidade do extrato de alho, avaliou-se, no presente estudo, em 60 e 90 minutos a permeabilidade dos neutrófilos, determinando-se que a maioria dos neutrófilos (>94%) permaneceram viáveis quando submetidos a diferentes concentrações de alho (Tabela 1). Desta maneira, a viabilidade celular foi satisfatória, ou seja, o *Allium sativum L.* não inibiu a viabilidade neutrofílica, ou seja, não foi citotóxico para neutrófilos humanos.

**Tabela 1** - Percentagem de células viáveis na presença e ausência (controle) de extrato etanólico de *Allium sativum L.*: Teste de exclusão do corante Azul de Trypan

Concentração (g/mL)	Porcentagem da viabilidade (média)	
	60 minutos	90 minutos
Controle	99,5%	99,5%
0,03	99,5%	96%
0,04	94%	96,5%
0,05	97%	95%
0,06	94,5%	94%

#### CONCLUSÕES

O extrato de alho demonstrou atividade antioxidante pelo ensaio químico do DPPH e ensaio com neutrófilos na presença de NBT, não prejudicou a viabilidade dos neutrófilos humanos e não é inibidor de mieloperoxidase. Estudos futuros envolvem ensaios de fagocitose, liberação de citocinas e quimiotaxia na presença do extrato para demonstrar o papel do alho durante uma infecção.

#### REFERÊNCIAS

APOLINÁRIO, A.C. et al. *Allium sativum L.* como agente terapêutico para diversas patologias: uma revisão. **BioFar Revista de Biologia e Farmácia**. Paraíba, v. 2, n. 1, 2008.

CASTRO, D.S.B. **Obtenção de extrato de Pitaya e avaliação da sua atividade antioxidante e antiproliferativa em linhagens celulares humanas de câncer de mama**. Rio de Janeiro, Dissertação (Mestrado) Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro, 2015.

CIARLINI, P.C. et al Efeito da vacina contra brucelose bovina sobre a capacidade neutrofílica de redução do NBT. **Ars Veterinaria**, Jaboticabal, SP, vol. 21, n° 2, p.251-256, 2005. Disponível em: <http://revistas.bvs-vet.org.br/ars/article/view/9322>. Acesso em: 22. Out. 2015.

CHANOCK, S. J.; BENNA, J.; SMITH, R. M.; BABIOR, B. M. The respiratory burst oxidase. **J. Biol. Chem**, v. 269: p. 24519-24522, 1994.

- CHENG, Z.; MOORE, J.; YU, L. High-throughput relative DPPH radical scavenging capacity assay. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 20, p. 7429-7436, 2006.
- COSTA, P. I. **Estudo da ação do veneno da cascavel sul-americana *Crotalus durissus terrificus* sobre leucócitos de rato.** Ribeirão Preto. Dissertação (Mestrado)- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, USP, 1991.
- FENGLIN, H; RUILI, L.; BAO, H.; LIANG, M. Free radical scavenging activity of extracts prepared from fresh leaves of selected Chinese medicinal plants. **Fitoterapia**, v. 75, n. 1, p. 14-23, 2004.
- GRASSI, R. **Alho.** <<http://www.uepg.br/fitofar/dados/Alho.pdf>>. Acesso em: 17. Mar. 2017.
- HOOGERHEIDE, E.S.S. **Divergência genética entre acessos de alho avaliados em ambientes distintos baseada em variáveis quantitativas e qualitativas.** Piracicaba, Tese apresentada na Universidade de São Paulo, 2009.
- KISS, A.C.I. *et al*, Efeito do extrato de *Allium sativum L.* sobre parâmetros bioquímicos de ratas com diabetes induzido por *Streptozotocin*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.8, n.3, p.24-30, 2006.
- KLASSA, B; GROSSELI, M. M.; KIYOMURA, A. K.; ALVES, M. J. Q. F. Avaliação do efeito do alho (*Allium sativum L.*) sobre o colesterol plasmático em coelhos com hipercolesterolemia induzida. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.15, n.4, p. 557-565, 2013,
- KOLACZKOWSKA, E.; KUBES, P. Neutrophil recruitment and function in health and inflammation. **Nature Reviews Immunology**. v. 13, n. 3, p. 159-175, 2013.
- KVIECINSKI, M. R. **Avaliação das atividades antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral do extrato bruto hidro-etanólico e frações de *Bidens pilosa L.* (Asteraceae).** Florianópolis, Dissertação(Mestrado)- Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- LIMA, K.S.P, **Avaliação da Actividade Antioxidante e Antimutagénica em Diferentes Infusões Mediciniais: Barbas de milho, Carqueja, Dente de Leão, Folhas de Oliveira e Urtiga-Branca.** 71.f.. Dissertação (Mestrado) - Tecnologia e Segurança Alimentar. Faculdade de Ciências e Tecnologia- Universidade Nova de Lisboa, Lisboa. 2011.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas.** 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. ISBN 8586714186, 9788586714184
- LÓS, D.W.S.; BARROS R.P.; NEVES J.D.S. Comercialização de plantas medicinais: um estudo etnobotânico nas feiras livres do município de Arapiraca-AL. **Revista de Biologia e Farmácia**. v. 7, n. 2, p.1983-4209, 2012.
- MARCHIORI, V. F. **Propriedades funcionais do alho (*Allium sativum L.*)** <<http://www.uepg.br/fitofar/dados/Alho.pdf>> Acesso em: 15. Mar. 2014
- MARQUEZ, L.A.; DUNFORD, H.B. Mechanism of the oxidation of 3,5,3',5'-tetramethylbenzidine by myeloperoxidase determined by transient- and steady-state kinetics. **Biochemistry**, v.36, n.31, p.9349-55, 1998.
- OLIVEIRA, C. R. A. **Avaliação prospectiva das atividades fagocitária e quimiotática de neutrófilos humanos quando submetidos ao plasma de pacientes sépticos.** Belo Horizonte, MG: Dissertação(Mestrado) - Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, 2012.
- PEDROSA, A. M. **Estudo de citotoxicidade, inflamação e estresse oxidativo em neutrófilos de pacientes com anemia falciforme: influência do tratamento com hidroxiuréia.** Fortaleza, CE: Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Ceará, 2013.
- PEIXOTO, A. P. C.; COSTA, J. N.; KOHAYAGAWA, A.; TAKAHIRA, R. K.; SAITO, M. E. Hemograma e metabolismo oxidativo dos neutrófilos de bovinos da raça Holandesa preta e branca - Influência dos fatores etários. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador, v. 3, n. 1, p. 16-20, 2002.
- QUEIROZ, Y.S. **Efeito do processamento do alho (*Allium sativum L.*) sobre os seus compostos bioativos e potencial antioxidante *in vitro* e *in vivo*.** São Paulo, Tese apresentada na Universidade de São Paulo, 2010.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMENEZ, J. P.; CALIXTO, F. D. S. Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. **Comunicado Técnico Embrapa**, v.127, p. 1-4, 2007.
- SANTOS, K. C. **Análise proteômica comparativa entre neutrófilos não ativados e neutrófilos ativados com PMA, um análogo do Diacilglicerol.** Brasília, DF: Dissertação (Mestrado) Universidade de Brasília, 2007.
- SEGAL, A. W.; ABO, A. The biochemical basis of the NADPH oxidase of phagocytes. **Trends Biochem. Sci.** v. 18, p. 43-47, 1993.
- SHRIVASTAVA, S.; GANESH, N. Tumor inhibition and Cytotoxicity assay by aqueous extract of onion (*Allium cepa*) & Garlic (*Allium sativum*): an in-vitro analysis. **International Journal of Phytomedicine** 2. 80-82, Jan. 2010.
- SILVA, E. Y. Y. **Propriedades funcionais “*in vitro*” de alhos frescos e processados.** 2009. Brasília, DF: Tese apresentada na Universidade de Brasília Faculdade de Ciência da Saúde, 2009.
- SILVA, S.O. **Oxidação de Melatonina Catalisada por Mieloperoxidase em Neutrófilos.** São Paulo, SP: Dissertação (Mestrado)- Universidade de São Paulo, 2001.
- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. S.; ARAÚJO, D. S. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n.2, p. 351-355, 2007.
- SOUZA, L.S.S. **Extratos aquosos de alho (*Allium sativum L.*) e sisal (*Agave sisalana Perrine*) no controle de *Aspergillus niger* e da podridão vermelha do sisal.** Cruz das Palmas, BA: Dissertação (Mestrado)- Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2010.
- URBACZEK, A. C. **Burst oxidativo dos neutrófilos humanos: estudo da influência do polimorfismo do receptor IgG FcγRIIIb na cooperação com os receptores para complemento.** Dissertação(Mestrado). Araranguara, Universidade Estadual Paulista, 2008.