



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA
AFROBRASILEIRA – UNILAB
PRÓ-REITORIA DE GRADUAÇÃO – PROGRAD
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA - ICEN
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS DA NATUREZA E MATEMÁTICA -
CNeM**

BLASCO QUEFI

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE DO ALHO (*Allium sativum* L.)

ACARAPE - CE

2017

BLASCO QUEFI

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE DO ALHO (*Allium sativum* L.)

Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) apresentado como parte dos requisitos para obtenção de grau de licenciado do Curso de licenciatura em Ciências da Natureza e Matemática com Habilitação em Química, do Instituto de Ciências Exatas e da Natureza - ICEN da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB, sob orientação do Prof. Dr. Aluísio Marques da Fonseca

ACARAPE - CE

2017

BLASCO QUEFI

ESTUDO FITOQUÍMICO E BIOLÓGICO DA ESPÉCIE DO ALHO (*Allium sativum* L.)

TCC apresentado ao Instituto da Ciência Exatas, na linha de formação específica em Química da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), como parte da exigência para obtenção do título de licenciatura Ciência Natureza e Matemática.

Aprovado em: 12/ 12 / 2017

Banca Examinadora

Prof.: Dr. Aluísio Marques da Fonseca (Orientador)

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB

Prof. Dr. Victor Emanuel Pessoa Martins - [Examinador 1]

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira - UNILAB

Ms. Davino Machado Andrade Neto - [Examinador 2]

Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira – UNILAB

AGRADECIMENTO

O sonho de voltar novamente ao meu país finalmente se realizou, depois de estar tanto tempo fora de casa.... agradeço a minha família que esperou durante todo esse tempo e compreendeu que tudo isso era para o meu crescimento como profissional.

Inicialmente gostaria de agradecer a Deus, que sempre me acompanhou durante os meus estudos e na vida. Ao meu pai-herói, Orlando Lafu Quefi, que está no outro do mundo (falecido), e minha rainha Judita Caunan pelo carinho, desde infância, até agora e acompanhou meu estudo e dos meus irmãos: João D. J. Quefi, Domingos D. J. Quefi, Terezinha M. R. Quefi, Luija M. R. Quefi, Maria D. R. Quefi, Filomena M. R. Quefi. Agradeço também aos meus irmãos: Julio Punef, Calisto Poto, Jasinta Quelo, Linda Napu, Julio da Conceição, Albina Lalus, Abilio D. J. Quefi, Roja Feno, Farancisco Lafo, Angelo Lafu, Jorge Lafo, Angelo da Conceição, Agostinho Lafu, Domingos Tali, aos meus Tios: Jasinto Mala, Batisca D. C. Caunan, minha Tia: Anita D.C. Baquin, Agostinho Punef, Joana Tali, Quintiliano Sufa e todas famílias (Quefi Sunny e Caunan), pela motivação, coragem e apoio ao estudo de todos.

Ao Governo de Timor Leste, através do Ministério da Educação do ensino superior, pelo financiamento do estudo no Brasil (UNILAB). A Universidade Nacional Timor Lorosa'e (UNTL) pela cooperação com a Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB).

Aos companheiros dos estudos da cooperação internacional em diferentes países: Angola, Brasil, Cabo Verde, Guiné-Bissau, Moçambique, São Tomé e Príncipe, especialmente meus amigos timorenses pela convivência em uma jornada do estudo, em especial dos amigos em habilitação de Química: Octavio, Justino, Maria, Margareta, Ramalho, Filomeno, Januário, Lizatória, Flavia e Alice, pela ajuda na minha pesquisa, e os outros: Abrão, Aquelino, Rafael, Natalino, Carlos e Jaime, Margarida Joana e todos os amigos Timorenses pelas brincadeiras e ajuda na coleta do material botânico.

A todos os professores e os técnicos do laboratório: Davino Machado, Camila, Ethanielda e Ana Kátia, pelo conhecimento a nós transmitidos e especial para os professores do Instituto de Ciências da Exatas e da Natureza (ICEN) do curso de Ciências da Natureza e Matemática (CNeM). Em especial, também para meu orientador, professor Dr. Aluísio Marques da Fonseca,

por toda a disponibilidade em ajudar e por todo o conhecimento. Agradeço também a Profa. Dra. Maria Iracema Bezerra Loiola, que me ajudou a identificar a espécie vegetal que deu origem a minha pesquisa, e agradeço pelo Sr. Nilson pela plantação do Alho.

Só queria dizer Muito Obrigado a todos!

A Deus

Aos meus pais, Orlando Lafu Quefi (Falecido) e Judita Caunan

*Aos meus irmãos; João de Jesus Quefi, Domingos de Jesus Quefi,
Luiza M. D. Quefi, Terezinha M. D. Quefi, Maria do R. Quefi, Filomena M. D. Quefi.*

*“Mesmo que seu pai tenha falecido, eu quero que todos vocês tenham sucesso nos estudos!
Sucesso é igual a ouro para mim, durante a minha presença e esforço para vocês”*

– PORTUGUÊS

*“Maske o nia apa (Mate), Maibe hau hakarak imi hotu sucesso ba estudo! Imi nia sucesso
hanesan osan mean bo’ot ida ba hau, durante haw nia presença i esforço ba imi hotu”*

– TETUN

*“Masti ho Ama an (Nmaet), Mas au loem he hi mipein alekot neo hi skol! Hi mipen alekot nane
namnes on Mnatu Naek mese neo kau, natuin au paot nok au be’ek neoki oke- oke”*

– UAB-METO

Judita Caunan

RESUMO

O *Allium sativum* L., uma espécie vegetal, pertencente à família amaryllidaceae, está inserida em um gênero de mais de 600 espécimes. Essa planta denominada “alho” é conhecida no Timor Leste como “*Lis Mutin*”. Sua utilização na medicina popular e ingrediente para uso na culinária e (condimento) já existe desde a antiguidade, tendo sua origem na Ásia central em clima úmido, incluindo os países Timor Leste e Brasil. O presente trabalho de pesquisa do extrato do *Allium sativum* L., visou estudar as propriedades antioxidantes, ou seja, verificar os compostos que apresentam a capacidade de inibir ou retardar a ação de espécies radicalares através da doação de elétrons, inibindo assim reações que podem levar ao envelhecimento precoce e doenças como arterosclerose e câncer, anti-bacterianas, antifúngicas e outras atividades biológicas. O resultado da análise fitoquímica, que foi avaliada na presença do extrato etanólico das folhas, apresentou teste positivo para: cumarinas, terpenoides, esteroides e alcaloides. A determinação da atividade antioxidante de compostos foi realizada pelo o 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 potencial avaliação antioxidante, observou-se que na maior concentração apresentou uma atividade inibitória de 66,5% para as folhas e 87,65 % para os bulbos. O IC₅₀ foi calculado a partir da curva de regressão linear e equação da reta. O IC₅₀ representou a concentração do extrato necessário para inibir 50% do radical livre DPPH, no extrato etanólico das folhas apresentou um IC₅₀ de 1.041,6 ppm, e o extrato etanólico dos bulbos apresentou um IC₅₀ de 282,6 ppm. Os resultados obtidos das toxicidades dos extratos etanólico dos bulbos e das folhas do *A. sativum* L. foram considerados satisfatórios. Onde se mostrou um gráfico processado pelo programa probit. Os extratos das folhas que foram testadas, frente ao crustáceo *Artemia salina*, apresentaram uma dose letal (DL₅₀) de 631,255 ppm, e o extrato nos bulbos com dose letal (DL₅₀) de 39,355 ppm. Esse trabalho objetivou-se inicialmente identificar as classes dos metabólitos secundários, além de avaliar o potencial antioxidante e a toxicidade dos extratos da espécie vegetal do *Allium sativum* L.

Palavras-Chave: *Allium sativum* L., fitoquímica, DPPH, potencial antioxidante, toxicidade.

ABSTRACT

Allium sativum L., a plant species belonging to the family amaryllidaceae, is inserted in a genus of more than 600 specimens. This plant called "garlic" is known in East Timor as "Lis Mutin". Its use in folk medicine and ingredient for use in cooking and (condiment) has existed since antiquity, having its origin in central Asia in humid climate, including the countries East Timor and Brazil. The present research work on the extract of *Allium sativum* L., aimed to study the antioxidant properties, ie to verify the compounds that have the ability to inhibit or retard the action of radical species through the electron donation, thus inhibiting reactions that can lead to early aging and diseases such as atherosclerosis and cancer, anti-bacterial, antifungal and other biological activities. The results of the phytochemical analysis, which was evaluated in the presence of the ethanolic extract of the leaves, presented positive test for: coumarins, terpenoids, steroids and alkaloids. The determination of the antioxidant activity of compounds 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. As a result of the potential antioxidant evaluation, it was observed that in the highest concentration showed an inhibitory activity of 66.5% for the leaves and 87.65% for the bulbs. The IC₅₀ was calculated from the linear regression curve and equation of the line. The IC₅₀ represented the concentration of the extract necessary to inhibit 50% of the DPPH free radical, in the ethanolic extract of the leaves it presented an IC₅₀ of 1,041.6 ppm, and the ethanolic extract of the bulbs showed an IC₅₀ of 282.6 ppm. The results obtained from the toxicities of the ethanolic extracts of the *A. sativum* L. bulbs and leaves were considered satisfactory. Where a graph processed by the probit program was shown. The leaf extracts that were tested against the crustacean *Artemia salina* presented a lethal dose (LD₅₀) of 631.255 ppm and the extract in the lethal dose bulbs (LD₅₀) of 39,355 ppm. The objective of this study was to identify the classes of secondary metabolites and to evaluate the antioxidant potential and toxicity of the extracts of the plant species of *Allium sativum* L.

Key words: *Allium sativum* L., phytochemistry, DPPH, antioxidant potential, toxicity

LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Tamanho da Espécie do (<i>Allium sativum</i> L.)22
Figura 02	A Plantação do alho (<i>Allium sativum</i> L.), no Sítio de Barreiros no Município de Aratuba.....24
Figura 03	Transformação aliína em alcina.....25
Figura 04	Estabilização do radical livre DPPH.....27
Figura 05	Estrutura de Ácido ascórbico29
Figura 06	Criação das Larvas de <i>Artemia salina</i>34
Figura 07	Teste Fitquímico das folhas do (<i>Allium sativum</i> L.).....39
Figura 08	Reação de identificação de cumarinas.....40
Figura 09	Avaliação Potencial antioxidante do extrato etanólico das folhas do (<i>Allium sativum</i> L.) avaliado pelo método de DPPH.....45
Figura 10	Avaliação Potencial Antioxidante do extrato etanólico do (<i>Allium sativum</i> L.) avaliado pelo método de DPPH..... 46

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 01	Porcentagem do analisado da mortalidade da <i>Artemia salina</i> do extrato etanólico das folhas do (<i>Allium sativum</i> L.) utilizando program do Probbit.....	42
Gráfico 02	Porcentagem do analisado da mortalidade da Artêmia salina do extrato etanólico do alho (<i>Allium sativum</i> L.) utilizando programa do Probit.....	43
Gráfico 03	Porcentagem da inibição de Radical Livre DPPH do extrato etanólico das folhas do (<i>Allium sativum</i> L.).....	46
Gráfico 04	Porcentagem da inibição de Radical Livre DPPH do extrato etanólico nos bulbos do (<i>Allium sativum</i> L.)	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Plantação da espécie do (<i>Allium sativum</i> L.).....	23
Tabela 02	Resultado das extrações etanólicas dos bulbos e folhas do (<i>Allium sativum</i> L.).....	37
Tabela 03	Resultado da Identificação dos metabólitos secundários do extrato etanólico de (<i>Allium sativum</i> L.).....	38
Tabela 04	Resultado do teste toxicidade do extrato etanólico das folhas do (<i>Allium sativum</i> L.) frente a <i>Artemia salina</i>	41
Tabela 05	Resultado do teste toxicidades do estrato etanólico dos bulbos (<i>Allium sativum</i> L.) frente a <i>Artemia salina</i>	42
Tabela 06	Avaliação Potencial Antioxidante do extrato etanólico das folhas do (<i>Allium sativum</i> L.).....	45
Tabela 07	Avaliação Potencial Antioxidante do extrato etanólico dos bulbos (<i>Allium sativum</i> L.).....	47

LISTA DE SIGLAS

DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
NO ₂	Grupos nitro
C	Átomo de carbono
H	Átomo de hidrogênio
IC ₅₀	Concentração de 50% de inibição
N	Átomo de nitrogênio
AA	Atividade antioxidante
DNA	Ácido desoxirribonucleico
UFC	Universidade Federal do Ceará
LABioCN	Laboratório de Biotecnologia e Ciências Naturais
UNILAB	Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira
HCl	Ácido clorídrico
NaOH	Hidróxido de sódio
KOH	Hidróxido de potássio
FeCl ₃	Cloreto férrico
DL ₅₀	Dose Letal 50%
λ	Comprimento de onda

LISTA DE SÍMBOLOS

nm	Unidade de medida: Nanômetros
g/mol	Razão: Grama/molar
%	Unidade: Porcentagem
°C	Unidade de temperatura: Graus Celsius
g/cm ³	Razão: Grama/centímetro ao cubo
kg	Unidade de massa: Quilogramas
g	Unidade de massa: Gramas
mg	Unidade de massa: Miligramas
mL	Unidade de volume: Mililitros
μM	Unidade: MicroMol
mM	Unidade: MiliMol
cm	Unidade de medida: Centímetro
m	Unidade de medida: Metros
ppm	Unidade: Parte por milhão

LISTA DE ABREVIATURAS

UV-Vis.	Ultravioleta-visível
Abs.	Absorbância
P. A.	Para análise

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 Objetivo Geral.....	19
2.2 Objetivos Específicos.....	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICO.....	20
3.1 Plantas Medicinais.....	20
3.2 Metabolismo secundário.....	20
3.3 Alho (<i>Allium sativum</i> L.)	21
3.3.1 Cultivo do alho.....	23
3.3.2 Composição da química.....	24
3.4 Avaliação Potencial Antioxidante.....	25
3.5 Metodologia do Sequestro do Radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).....	26
3.6 Ácido ascórbico.....	28
3.7 Atividade de Toxicidade.....	29
4. METODOLOGIA.....	31
4.1 Obtenção do material botânico.....	31
4.2 Coleta e obtenção dos extratos vegetais.....	31
4.3 Identificação dos metabólitos secundários no extrato etanólico da espécie <i>Allium sativum</i> L.....	31
4.4 Teste da toxicidade frente as larvas <i>Artemia salina</i>	33
4.5 Teste da atividade potencial antioxidante.....	35
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
5.1 Obtenção dos extratos.....	36
5.2 Identificação dos metabólitos secundários.....	36
5.3 Teste da toxicidade frente as larvas <i>Artemia salina</i>	40
5.4 Análise de atividade potencial antioxidante.	43
6. CONCLUSÃO	48
7. REFERÊNCIAS.....	49

1. INTRODUÇÃO

O alho (*Allium sativum* L.) é uma planta monocotiledônea de clima mais úmido, temperado, cultivada em todo o mundo e utilizado também como especiaria no preparo de alimentos (MOTA *et al.*, 2012). 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 principalmente a população da menos renda familiar (PINTO, 2002). Como desde os primórdios as plantas curativas foram sendo descobertas pelos homens através de observações do comportamento de animais que utilizavam os vegetais para curar as próprias enfermidades, há muito tempo a espécie do alho vem sendo utilizada na medicina popular (SANTOS *et al.*, 2011). Então a humanidade começou a utilizar recursos terapêuticos de plantas através do consumo de chás, utilizados, na maioria das vezes, em rituais sagrados como na medicina tradicional. Atualmente, o ramo do conhecimento que faz uso de plantas medicinais para curar doenças é denominado de fitoterapia (FRANÇA *et al.*, 2008).

Portanto, os produtos naturais existentes são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais. Então a farmacológica se utiliza as plantas medicinais como fonte de novos recursos terapêuticos e no desenvolvimento de novos medicamentos. Porém, os cientistas que buscam novos estudos com intuito de investigar plantas para aliviar e curar determinadas doenças através da ingestão de ervas e/ou folhas, talvez possa ter sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (FIRMO *et al.*, 2011; COSTA- LOTUFO *et al.*, 2010).

O alho é um vegetal da espécie *Allium sativum* L., considerado uma erva aromática pertencente à família Amaryllidaceae. Esta espécie é considerada um alimento, baseando-se pela história da humanidade, usada tanto na medicina popular como na culinária. O *Allium sativum* L., possui vários nutrientes, e o que mais se destacam na composição nutricional, são os altos teores dos elementos zinco (Zn) e selênio (Se), ambos metais de natureza antioxidante (LEONÊZ, 2008). Além disso, possuem ação antiviral, antifúngica e antibiótica (DALONSO, *et al.*, 2009).

No século XIX, junto à alquimia, investigou-se o processo de purificação de extratos vegetais. Foi adaptado uma metodologia que possibilitou a ascensão da alopatia, na qual consiste na utilização de medicamentos capazes de gerar e inibir um efeito no organismo das reações dos compostos químicos contrários aos sintomas apresentados a fim de diminuí-los ou de neutralizá-

los. Porém as doses das substâncias utilizadas encontram-se no limite da toxicidade, quase sempre produzindo efeitos colaterais (FRANÇA *et al.*, 2008). Logo depois, os pesquisadores que descobriram novos estudos em produtos naturais para o tratamento das doenças (PINTO, 2002).

O Brasil é a maior biodiversidade no mundo, atualmente tem se utilizado determinados metabólitos secundários com potencial biológico como base fundamental para medicamentos tradicionais. O alho (*Allium sativum* L.) é amplamente aplicado na medicina ou funcional (ZAPAROLLI *et al.*, 2013). Dentro desta espécie tem alguns pesquisadores que foram descobrindo novos 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 amplificação da medida das células, além da maior produção de citoxinas pró-inflamatórias sem que se observe efeito hepatotóxico (LOZANO, 2015). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) no início da década de 1990, afirmava-se que acerca de 65-80% da população do país dependiam das plantas medicinais como a única forma de acesso a medicamento, então a população ao longo dos anos em comunidades tradicionais, se fez do uso e eficácia de plantas medicinais, contribuindo para o fortalecimento da exploração de novas estratégias em processos terapêuticos (CASTRO, 2006).

No entanto o país de Timor-Leste, onde existe um número significativo de elevações montanhosas e cidades o que torna a ilha muito acidentada. No ambiente urbano possuem inúmeros vegetais e ervas aromáticas, utilizadas como medicinais populares (COSTA, 2010). Um desses vegetais, o alho “Lis Mutin”, vem sido sempre cultivado em lugares úmidos e clima tropical em todos os municípios de Timor-Leste, o que se torna é uma grande vantagem sobre as plantas medicinais e favorecendo uma vida mais equilibrada e saudável aos cidadãos Timorenses.

O interesse pelo objeto de pesquisa em produtos naturais a correlação com as plantas medicinais no Timor leste, se confirma por que a população de um modo geral se utiliza muito das plantas para curar as doenças, considerando como medicina tradicional no país. Dentre o estudo etnofarmacológico, a planta já foi utilizada para: malária, dor nos dentes, tensão, e no parto. Com esses dados, é possível que essa pesquisa, possa se agrandar mais valor a espécie vegetal estudada no Timor Leste. O presente trabalho utilizou a referida espécie na tentativa de descobrir novos fármacos e realizar triagem fitoquímica, avaliação antioxidante e toxicidade.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Avaliar o perfil fitoquímico e identificar a presença de possíveis metabólitos secundários presentes em *Allium sativum* L.

2.2 Objetivos específicos

- Realizar o ensaio fitoquímico para identificar as classes dos metabólitos secundários;
- Avaliar a toxicidade do extrato da planta frente a larva de *Artemia salina*.
- Identificar as atividades antioxidantes, e algumas atividades biológicas no espécie *A. sativum* L.;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICO

3.1 Plantas Medicinais

A química de produtos naturais tem por objetivo imediato o esclarecimento e registro dos constituintes resultantes dos metabólitos secundários dos seres vivos, através de seu isolamento e elucidação de suas estruturas moleculares (MATOS, 2009). Atualmente, há um crescente interesse na pesquisa com plantas medicinais, decorrentes de diversos fatores; dentre eles destacam-se: o crescimento exponencial do mercado de medicamentos fitoterápicos, o marcante interesse das grandes indústrias por esse setor e os resultados satisfatórios em termos terapêuticos que vários fitoterápicos apresentaram nos últimos anos (PONTE, 2003). A maioria da população dos países em desenvolvimento utiliza as plantas medicinais para satisfazerem suas necessidades em saúde, sendo frequentemente empregadas em serviço primárias e atendimento básico em saúde (PESSUTO, 2006). A utilização de plantas com objetivos terapêuticos é descrita desde 2.800 antes de Cristo, observando-se nos últimos anos um aumento no seu consumo em substituição a determinados medicamentos alopáticos (LOZANO, 2015).

Ao longo do tempo, o país tem dado importância as plantas medicinais, pois frequentemente é um tema recorrente na pauta da ciência brasileira de um modo geral. Por ser unanimidade entre químicos e farmacólogos brasileiros de reconhecida expressão internacional, o estudo com plantas medicinais ainda não receberam no Brasil, a atenção que o tema merece das agências financiadoras, embora já exista uma massa crítica de pesquisadores qualificados nas áreas de química e farmacologia. Até o presente momento, não houve um processo coordenado de todos os atores (indústria, farmacólogos, fitoquímicos, químicos sintéticos, farmacêuticos, médicos, etc) visando o desenvolvimento de fármacos a partir de plantas (PINTO; 2002).

3.2 Metabolismo secundário

Os metabólitos secundários de diversas espécies vegetais continuam sendo importante fonte ou modelo no planejamento de novos fármacos semi-sintéticos ou sintéticos (PONTE, 2003). As plantas produzem uma grande variedade de metabólitos secundários que frequentemente são relacionados a mecanismos de proteção da planta contra predadores e patógenos. As espécies tóxicas são aquelas capazes de produzir compostos que podem causar alterações metabólicas prejudiciais ao homem e aos animais (CAMPOS, 2016). Segundo Pinto, de uma forma geral, tem se produzido a maioria das substâncias orgânicas conhecidas através dos

esqueletos dos metabólitos secundários. Dentre os diversos reinos da natureza, o reino vegetal é o que tem mais contribuído, de forma significativa, para o fornecimento de metabólitos secundários, muitos destes de grande valor agregado devido às suas aplicações em medicamentos, cosméticos, alimentos e produtos agroquímicos.

A natureza vegetal será sempre uma fonte inesgotável de substâncias úteis, como os metabólitos secundários, mas quase sempre produzidos em quantidades insuficientes para qualquer utilidade econômica (PINTO; 2002).

Dentro da pesquisa, de uma forma a complementar, além dos estudos fitoquímicos, é importante associá-los a bioensaios, por esta razão, muitos laboratórios de Produtos Naturais têm inserido dentro de suas rotinas ensaios biológicos simples, no intuito de selecionar e monitorar a pesquisa de extratos de plantas na procura de substâncias bioativas (NASCIMENTO *et al.*, 2008). Os metabólitos secundários produzidos pelos vegetais são formados por vários caminhos biossintéticos que produzem moléculas dotadas de grande diversidade de esqueletos e grupamentos funcionais, como, entre outros, ácidos graxos (gorduras) e seus ésteres, hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos e cetonas, compostos acetilênicos, alcalóides, compostos fenólicos e cumarinas. Além do metabolismo primário, responsável pela produção de celulose, lignina, proteínas, lipídios, açúcares e outras substâncias que realizam suas principais funções vitais, as plantas também apresentam o chamado metabolismo secundário, do qual resultam substâncias de baixo peso molecular, às vezes produzidas em pequenas quantidades (MORAIS *et al.*, 2016).

3.3 Alho (*Allium sativum* L.)

O alho (Figura 1), é uma espécie cultivada há milhares de anos, sendo o seu centro principal de origem as zonas temperadas da Ásia Central, de onde se espalhou por toda a região do Mediterrâneo (GALANTE, 2008). Esta erva aromática foi muito utilizada por varias civilizações egípcias, chinesas, indianas e gregas (CONCEIÇÃO, 2013; ANDRÉ, 2010).

O posicionamento taxonômico do gênero *Allium* tem sido motivo de controvérsia, sendo algumas vezes incluído na família Liliaceae e outras vezes na Amaryllidaceae (classe Monocotyledones, ordem Asparagales), conforme a ênfase em determinadas características morfológicas, fisiológicas e bioquímicas. Mais recentemente, a combinação de dados morfológicos e moleculares tem reforçado a ideia de que cerca de 750 espécies do gênero *Allium*

pertencem, de fato, a uma família monofilética “Alliaceae” que é distinta, mas estreitamente relacionada com a família Amaryllidaceae (SILVA, 2009). Sua introdução nas regiões ocidentais se deu por navegadores espanhóis, portugueses e franceses (Mota *et al.*, 2005). A partir deste meio tem os diversos benefícios ligados ao consumo de alho têm sido associadas à sua ação microbiana, antitrombótica, anticancerígena, antiaterosclerótica, antioxidante, fortalecedora do Sistema imunológico, hipolipidêmica, hipoglicêmica e hipotensora (MARIUTTI e BRAGAGNOLO, 2009). Diante disso, o funcionamento sobre a atividade antioxidantes destes vegetais se atribui, principalmente, a saponinas, flavonoides, fenóis e compostos organossulfurados (WANG *et al.*, 2015). O alho é uma planta herbácea com altura variando de 40 a 60 cm, de folhas lanceoladas estreitas ou largas, de superfície lisa, com diferentes graus de serosidade e limbo com 20 a 30 cm de comprimento (BREWSTER, 2008; BACELAR, 2014).

Figura 1. Tamanho do *Allium sativum* L.



(A). Bulbinho com raiz fasciculada

(B). Escala em centímetros.

Autor: BREWSTER, 2008.

Segundo Rivlin (2001), o alho é utilizado de forma medicinal, como tempero e como alimento há mais de cinco mil anos, sendo um dos primeiros fitoterápicos já registrados. É considerado eficaz no tratamento de doenças e na manutenção da saúde (Lozano, 2015). O alho é uma planta constituída por folhas escamiformes e um bulbo ou cabeça utilizada para fins medicinais e como tempero (BLOCK, 2010), por possuir sulfóxidos de cisteína, composto responsável pelo odor e paladar característicos (FRITSCH *et al.*, 2006). Além disso, contém

alicina, um líquido amarelado que aparece após a trituração ou o corte do alho, sendo responsável por parte das propriedades farmacêuticas da planta (OLVEIRA, 2015).

Segundo Galante (2008) a utilização de substâncias naturais no tratamento das mais diversas patologias é antiga e vem reflorescendo com grande força atualmente. O alho tem efeito multiterapêutico em humanos, sendo que as primeiras evidências descritas pelos antigos sobre sua ação medicinal eram de ser um potente antibiótico. Relatos posteriores demonstraram efeitos benéficos na prevenção de doenças cardiovasculares como a aterosclerose e doenças coronarianas com redução nos níveis de colesterol, triglicérido e pressão arterial, além de possuir atividade anti-trombótica com atuação sobre as plaquetas. Benkeblia (2005) destaca que extratos de *Allium* possuem propriedades antioxidantes, as quais estão correlacionadas ao conteúdo total de compostos fenólicos. Porém, além dos compostos fenólicos, componentes sulfurosos podem estar envolvidos na avaliação destas propriedades. Também ressalta que o cozimento reduz a atividade antioxidante dos extratos.

3.3.1 Cultivo do Alho

No que diz respeito às condições climáticas, o alho é cultivado em clima frio, suportando bem baixas temperaturas, sendo, inclusive, resistente a geadas. A planta exige pouco frio no início da cultura, muito no meio do ciclo e dias longos no final. Portanto, temperatura e fotoperíodo são fatores de clima extremamente importantes à cultura do alho, influenciando na fase vegetativa, no bom desenvolvimento e na produtividade (GALANTE, 2008). A situação da climática sobre plantação do alho está apresentado na Tabela 1.

Tabela 01. Plantação do Alho (*Allium sativum* L.)

Sul	Sudeste	Nordeste	Centro-oeste	Norte
Maio /Junho	Março / Abril	Maio	Março / Abril	#

Fonte: Autor, 2017.

Figura 2. A plantação do alho (*Allium sativum* L.), no Sítio de Barreiros no Município de Aratuba.



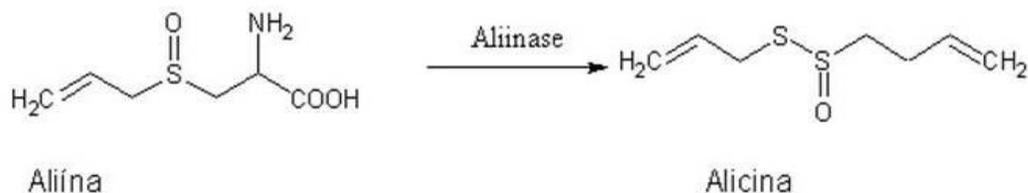
Fonte: Autor, 2017.

3.3.2 Composição química

O alho é utilizado na composição de medicamentos em função de possuir propriedades antimicrobianas, favorecendo o coração e o sistema circulatório. Além disso, possui diversas vitaminas, tais como: A, B2, B6, C, aminoácidos, ferro, silício, iodo, enzimas e a alicina, podendo ser utilizado no tratamento de doenças causadas por bactérias e fungos (QUEROZ, 2010). Através do espécie do *Allium sativum* L., Pode-se constatar-se que o alho apresenta altos níveis de fósforo, potássio, compostos sulfúricos e zinco, baixo conteúdo de cálcio, magnésio, sódio, ferro, manganês e vitaminas do complexo B (AGARWAL, 1996 *apud* ABIB, 2004, GALANTE, 2008).

O aroma e o gosto tão característicos da diferentes espécies de *Allium* se devem ao seu conteúdo elevado de vários compostos fitoquímicos sulfurados” (Magalhães, 2007). Quando um dente de alho é amassado algumas células que formam o bulbo são quebradas, liberando uma enzima chamada de aliína que em contato com outra enzima chamada de aliinase forma a alicina, a estrutura apresentando **Figura 03**.

Figura 03. Transformação da aliína em alicina.



Fonte: Machado, 2010

De acordo com Pinheiro *et al.*, 2005 as substâncias são fundamentais no crescimento e metabolismo celular intervindo em funções básicas como o metabolismo, o equilíbrio mineral do organismo e a conservação de estruturas moleculares e tecidos. Estudos posteriores reportam também a presença dos bioflavonóides: rutina, hesperidina e quercetina, que possuem a propriedade de proteger as células contra radicais livres (BONTEMPO, 2007). Outros componentes são a pectina, uma saponina esteroideal, ajoeno e a adenosina, esta quando proveniente do alho *in vitro*, promove inibição da agregação plaquetária e é benéfica à pressão arterial (ABIB JUNIOR, 2004).

3.4 Avaliação Potencial Antioxidante

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (ALMEIDA, 2005). Segundo Sucupira, um antioxidante pode ser definido como uma substância que, em baixas concentrações, retarda ou previne a oxidação do substrato. Algumas características são necessárias para ser considerado um bom antioxidante, por exemplo, ter a presença de substituintes doadores de elétrons ou de hidrogênio ao radical, em função de seu potencial de redução; capacidade de deslocamento do radical formado em sua estrutura; capacidade de quelar metais de transição implicados no processo oxidativo; e acesso ao local de ação, dependendo de sua hidrofília ou lipofília e de seu coeficiente de partição (SUCUPIRA, 2012).

Os antioxidantes podem ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos (Pereira, 2008). Vários estudos têm indicado o papel-chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo

envelhecimento e pelas doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (DUZZIONI, 2010). Os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonóides e derivados de ácido cinâmico (ácido caféico) (CAVALCANTE, 2006). A atividade dos antioxidantes, por sua vez, depende de sua estrutura química, podendo ser determinada pela ação da molécula como agente redutor (velocidade de inativação do radical livre, reatividade com outros antioxidantes e potencial de quelação de metais (NEVES, 2009).

3.5 Metodologia do sequestro do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil).

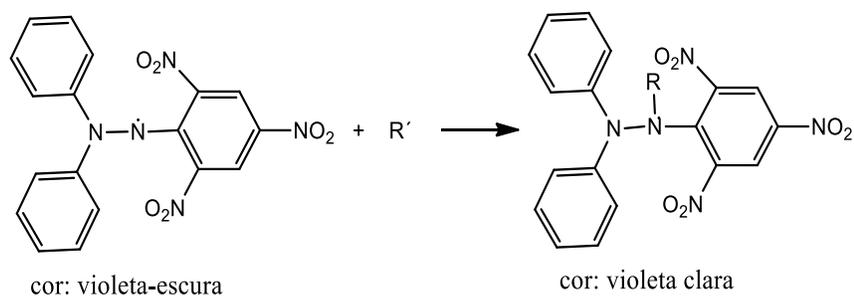
Os radicais livres e outros oxidantes, vem sendo considerados nos últimos anos como grandes causadores de várias doenças como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais e diabetes mellitus tipo I (Sousa *et al.*, 2007). Segundo (Duzzioni, 2010) a atividade antioxidante de um composto ou extrato pode ser estimada após sua adição em solução metanólica de DPPH. A redução do DPPH é acompanhada pelo monitoramento do decréscimo da absorvância a um determinado comprimento de onda Assim, como o DPPH confere cor à solução, um máximo de absorvância em 520 nm, medido em espectroscopia, é observado e conforme as espécies radicais são consumidas, verifica-se um decréscimo da absorvância nesta região (LEME, 2015). Na equação sugerida por estes autores (Brand-Williams *et al.*, 1995; Mensor *et al.*, 2001), emprega-se como controle a solução de DPPH sem a amostra, e as absorvâncias obtidas são convertidas em porcentagem de sequestro do radical DPPH.

Assim, como o DPPH confere cor à solução, um máximo de absorvância em 520 nm, medido em espectroscopia, é observado e conforme as espécies radicais são consumidas, verifica-se um decréscimo da absorvância nesta região. Na equação sugerida por estes autores (Mensor *et al.*, 2001), emprega-se como controle a solução de DPPH sem a amostra, e as absorvâncias obtidas são convertidas em porcentagem de sequestro do radical DPPH. A padronização do método DPPH elimina umas das principais desvantagens desse método, que seria as diferentes maneiras de interpretar e determinar a capacidade antioxidante de uma determinada substância (OLIVEIRA, 2005).

A molécula DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é considerada um radical livre estável devido a deslocalização dos elétrons desemparelhados ao longo de toda a molécula, devido a isto, este radical não sofre dimerização, ou seja, não há reação entre duas moléculas de DPPH formando um produto não reativo como na etapa de terminação comum às demais espécies reativas (LEME, 2015).

Esta metodologia baseia-se na capacidade em que o agente antioxidante de um determinado composto apresenta em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o a sua forma não radical denominada hidrazina, observada na Figura 3. Esta redução do radical é obtida simultaneamente a alteração da coloração violeta da solução a amarelo pálido (ALVES *et al.*, 2010).

Figura 4. Estabilização do radical livre DPPH.



Fonte: Rufino *et al.*, 2007

Dentro deste método de DPPH foram utilizados a formula seguinte:

$$\% \text{ Inibição DPPH} = \left(\frac{(Abs_{DPPH} - Abs_{amostra})}{Abs_{DPPH}} \right) \times 100\%$$

Onde:

Abs_{DPPH} = absorvância da solução metanólica do radical DPPH

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

Estes métodos são chamados de métodos de calibração multivariados, os quais correlacionam conjuntos de variáveis de cada amostra com a medida padrão, de forma a oferecer um modelo matemático para possibilitar a aplicação de outro método no lugar daquele de referência (MORAIS *et al.*, 2014). Assim, a proposta deste trabalho foi correlacionar as análises hoje realizadas por métodos clássicos com as análises obtidas por espectroscopia nas regiões

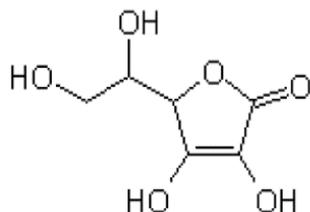
ultravioleta e visível do espectro eletromagnético, com a finalidade de agilizar as análises e diminuir a quantidade de etapas necessárias para se quantificar o teor antioxidante de alimentos naturais (LEME, 2015). Segundo Brand-Williams *et al* (1995), avaliaram a atividade antioxidante de compostos como o ácido ascórbico e estabeleceram que a interação entre a atividade antioxidante de um composto com o radical DPPH depende da conformação estrutural e a quantidade de grupos hidroxílicos disponíveis. Entretanto, o mecanismo para as demais substâncias testadas apresenta-se mais complexo, sendo necessárias avaliações posteriores.

3.6 Ácido ascórbico

O escorbuto foi descrito em 500 a.C. por Hipócrates. Em hieróglifos egípcios datados de cerca de 300 a.C., há várias descrições do que provavelmente seria a doença. Durante séculos, o escorbuto foi identificado durante campanhas militares, expedições científicas e, principalmente, se tornou uma doença endêmica na Europa durante as Grandes Navegações no século XVI (Vannucchi, 2012). A vitamina C se encontra presente em todas as células animais e vegetais principalmente na forma livre e, também, unida às proteínas. Segundo a literatura, estão no reino vegetal as fontes importantes do ácido ascórbico representadas por vegetais folhosos, legumes e frutas (Pereira, 2008).

A capacidade redutora do ácido ascórbico faz parte de várias reações bioquímicas e caracteriza sua função biológica. Essa vitamina também pode reduzir espécies reativas de oxigênio. Sua principal função é como cofator de numerosas reações que requerem cobre e ferro reduzidos como antioxidantes hidrossolúveis que atuam em ambientes intra e extracelulares (VANNUCCHI, 2012). Às vezes, o ácido ascórbico sintético pode ser idêntico ao ácido ascórbico presente em alimentos naturais. Geralmente é produzido a partir de um açúcar natural, uma dextrose (glicose, açúcar de mel, açúcar de milho). Este açúcar de fórmula química $C_6H_{12}O_6$ se converte em L-ácido ascórbico ($C_6H_8O_6$), Figura 4. por reação de oxidação onde quatro átomos de hidrogênio são removidos para formar duas moléculas de água (COULTATE, 2004).

Figura 5. Estrutura de Ácido ascórbico



Fonte: VANNUCCHI, 2012.

3.7 Atividade de toxicidade

A toxicidade apresentada por uma espécie vegetal pode estar relacionada a fatores associados ao indivíduo, à planta, ao modo de exposição e a questões ambientais (CAMPOS, 2016). A presença de compostos tóxicos naturais em alguns alimentos vegetais é um fato relativamente comum que evidencia a necessidade de se dispor de técnicas analíticas eficientes na detecção de tais substâncias, garantindo assim a qualidade dos produtos e a saúde dos consumidores (RODRIGUEZ, 2009). Desta forma, *A. salina* tem sido usada como um organismo alvo para detectar compostos bioativos em extratos de plantas (Alves *et al.*, 2000).

O teste de toxicidade contra a *Artemia salina* (TAS) é um ensaio biológico considerado como uma das ferramentas mais utilizadas para a avaliação preliminar de toxicidade (AMARANTE., *et al.*, 2011). Visando minimizar a utilização de animais de laboratório para estabelecer a segurança de produtos naturais, o ensaio de letalidade com as larvas do microcrustáceo *Artemia salina* vem sendo amplamente utilizado em centros de pesquisa, podendo, na busca de moluscidas naturais, determinar possível toxicidade contra organismos não-alvo como os peixes e pequenos crustáceos (SANTOS, *et al.*, 2011).

O estudo das plantas tóxicas vem ganhando importância, pois, além de esclarecer diferentes aspectos dos casos de intoxicações pode ainda fornecer compostos líderes para o desenvolvimento de fármacos (Harvey, *et al.*, 1998). Este bioensaio, além de determinar a toxicidade geral, apresenta uma boa correlação com atividade citotóxica em alguns tipos de tumores sólidos, podendo também determinar possível propriedade larvicida e tóxica contra alguns tipos de protozoários (SANTOS, *et al.*, 2010). Um exemplo da utilização de plantas tóxicas na descoberta de novos medicamentos foi o desenvolvimento dos bloqueadores

neuromusculares a partir do curare (CAMPOS, *et al.*, 2016). Segundo Viegas Junior *et al.*, (2006), os trabalhos com o curare deram início aos estudos sobre a relação entre estrutura química e atividade biológica.

4. METODOLOGIA

4.1 Obtenção do material botânico

A identificação do material vegetal foi realizada pela botânica Profa. Dra. Maria Iracema Bezerra Loiola, em agosto de 2017, na UFC, campus do PICI, no Herbário Prisco Bezerra, departamento de Biologia. A exsicata foi depositada no herbário sob o nº de registro **EAC #60569**.

4.2 Coleta e Obtenção dos Extratos Vegetais

Os Alhos e as folhas do Alho (*Allium sativum* L.) foram coletados entre os meses setembro e outubro de 2017, no Município de Aratuba, bairro Sítio de Barreiros (CE) nas coordenadas 4°23'46''S e 39°1'7''W.

Depois de coletar os materiais vegetais frescos foram secos na estufa com temperatura de 45°C, durante 7 dias, posteriormente foram trituradas em liquidificador industrial. Logo em seguida, foi adicionado o solvente orgânico (etanol) P.A. durante 3 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 do alho e das folhas.

A pesquisa do projeto foram realizados no Laboratório de Biotecnologia e Ciências Naturais (LABioCN)/Química Orgânica da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), nos campos das Auroras.

4.3 Identificação dos metabólitos secundários no extrato etanólico da espécie *Allium sativum* L.

Os extratos adquiridos foram utilizados para teste de fitoquímica para identificação das classes metabólitos secundários. Inicialmente preparou a solução do extrato aquoso, em seguida pesou-se 600 mg de amostra do extratos bruto e dissolveu-se em uma solução hidroalcolica (80%).

A metodologia que foi utilizada para a detecção dos grupos de metabólitos secundários foi proposta por Dodd's e Roberts (1984) e adaptado por Vishwakarma *et al.*, (2014), Matos (2009), Leme (2015), Fernandes e Fonseca *et al.*, (2017) e Silva e Lima, (2016). No extrato etanólico das folhas, foram realizados os seguintes testes: Alcalóides, Cumarinas, Flavonóides, Taninos, Saponinas, Terpenóides e Esteróides.

4.3.1 Teste para identificação de alcalóides

Para realizar o ensaio utilizou-se 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.

4.3.2 Teste para identificação de cumarinas

Em um tubo de ensaio colocou-se 2,0 mL da solução estoque, adicionou-se 2 mL de NaOH 10%, formação de cor amarela, que indicam a presença de cumarinas.

4.3.3 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 é indicativo a presença de flavonóis, flavononas, flavononóis e xantonas e Flavonóides.

4.3.4 Teste para identificação de Taninos

Colocou-se 2 mL da solução estoque em um tubo de ensaio e adicionou 2 gotas de FeCl_3 10%. Aparecimento de precipitado escuro de tonalidade azul indica à presença de taninos hidrossolúveis e verde a presença de taninos condensados.

4.3.5 Teste para identificação de saponinas

Neste ensaio, com 2,0 mL da solução estoque, foi adicionado 5,0 mL de água destilada e aqueceu-se em banho maria a 10 minutos. Após resfriamento, agitou-se vigorosamente, deixando em repouso por 20 minutos. Classifica-se a presença de saponinas pela formação de espumas persistente.

4.3.6 Teste para identificação de terpenóides

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

4.3.7 Teste para identificação de esteróides

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 indicativo a presença desse metabólito. Assim indicativo a presença de esteroides.

4.4 Teste da toxicidade frente as larvas *Artemia salina*

O teste de toxicidade frente à *Artemia salina* foi realizado através da adaptação da metodologia de Rosa *et al.*, (2016); Amarante *et al.*, (2011); Meyer *et al.*, (1982).

A avaliação da toxicidade dos extratos e frações foi realizada através do bioensaio com *Artemia salina*. O ensaio foi feito em triplicata durante o teste da avaliação da toxicidade tanto nas folhas e alho. Em seguida preparou-se a solução de estoque da concentração de 1 mg/mL ou 1000 ppm. Após a eclosão dos ovos utilizou-se 14 mg dos extratos etanólicos das folhas e alho e se dissolveu em 14 mL de DMSO 1%, a solução estoque que foi preparado diluíram-se em 5 tubos de ensaio com diferentes concentração a partir de (500, 250, 125, 62,5, 31,2 ppm). Para calcular DL₅₀ foi utilizado o método PROBIT ANALYSIS, e considerou-se baixa toxicidade quando a dose letal 50% (DL₅₀) foi superior a 500 µg.mL⁻¹ e muito tóxico quando a DL₅₀ foi inferior 100 µg.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 com uma solução de sal marinho na concentração 60 g/L, 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 *Artemia 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 35 mg de cistos de *Artemia 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°C à 29°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, no mínimo, três vezes, totalizando um mínimo de 10 ensaios por concentração do composto. Durante a teste foi acompanhado de controle negativo somente água salina.

Figura 6. Criação das Larvas de *Artemia Salina*



Fonte: Autor, 2017

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 fórmula de Abbott`s:

$$\% \text{ mortalidade} = \frac{X - Y}{100 - Y} \times 100$$

Onde:

X = percentual mortalidade na amostra tratada;

Y = percentual mortalidade no controle.

4.5 Teste da atividade potencial antioxidante

A partir do extrato bruto, foi analisada sua 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 isso, realizou-se a leitura em espectrofotômetro UV/Vis. na região de 520 nm. Etanol foi utilizado para calibrar o espectrofotômetro, e DPPH foi utilizado como controle negativo e ácido ascórbico como controle positivo. O ensaio foi realizado em triplicata. Foi utilizado a metodologia de Alves *et al.*, (2010); Rufino *et al.*, (2007); Silva *et al.*, (2012), Orlanda e Vale (2015), Menezes e Fonseca *et al.*, (2015) e Sousa *et al.*, (2007).

A porcentagem da atividade antioxidante de radicais livres de DPPH foi calculada a seguinte

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

Onde:

Abs_{DPPH} = absorbância da solução etanólico do radical DPPH;

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

O valor de IC₅₀ foi utilizado necessariamente para inibir 50% da sequestral radical Livre DPPH inicial. Foi calculado através da equação da reta do gráfico.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Obtenção dos extratos

O material vegetal do alho (*Allium sativum* L.) foi coletado (1 kg), e folhas (1 kg) de *Allium sativum* L. Logo em seguida, foram secados e macerados com etanol P.A. durante o processo da pesquisa foi atingiu-se a cerca de 13,116 g (5,83 % de rendimento) dos bulbos, e o extrato etanólico das folhas obteve-se 16,05 g (5,61 % de rendimento), os resultados estão na **Tabela 2.**

Tabela 2. Resultados das extrações dos extratos etanólicos dos bulbos e folhas do (*Allium sativum* L.)

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

Fonte: Autor, 2017.

5.2 Identificação dos metabólitos secundários

Existe diversas funções atribuídas nos testes fitoquímicos nas plantas. Entre elas pode-se 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 foi relatado pelo todo reino de vegetal (CARRERA *et al.*, 2014). Os resultados dos metabólitos secundários estão na **Tabela 3** e na **Figura 6.**

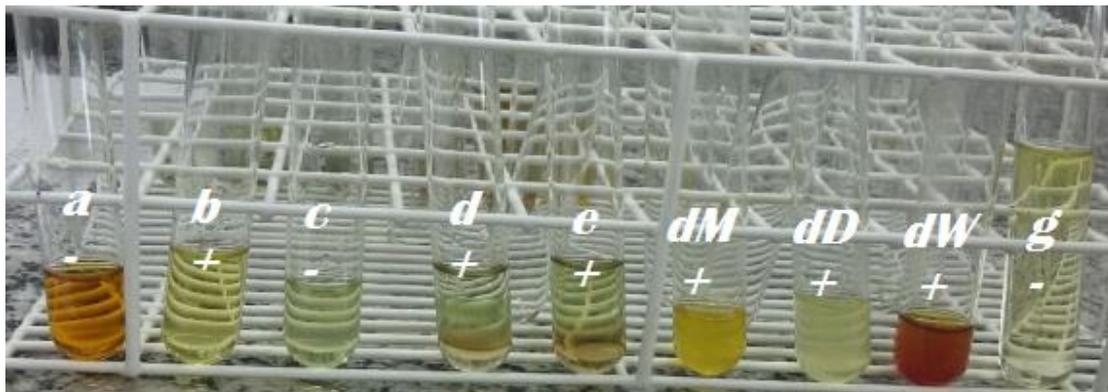
Tabela 3. Resultado da Identificação dos metabólitos secundários do extrato etanólico de (*Allium sativum* L).

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	+
	Reagente Mayer	+
Alcalóides	Reagente Wagner	+
	Reagente Dragendroff	+
Saponinas	Formação de espuma	-

PARAMETROS: positivo (+), negativo (-)

Os testes fitoquímicos baseado no extrato etanólico das folhas do (*Allium sativum* L.) foram identificados através dos reagentes específicos. Os resultados estão apresentados na **Figura 6.**

Figura 7. Teste Fitoquímico das folhas do (*Allium sativum* L.)



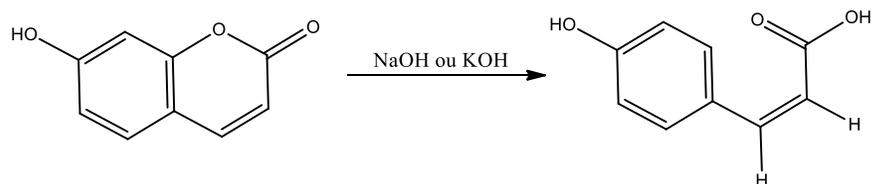
Fonte: Autor, 2017.

- a) Taninos e Fenóis, b) Cumarinas, c) Flavonóides, d) Terpenóides, e) Esteroides, f) Alcaloides (Mayer, Dragendroff), g) Saponinas.

A partir dos resultados obtidos da análise fitoquímica, observou-se que dentro da espécie vegetal do *Allium sativum* L., no extrato etanólico, a grande maioria esteve presente na classe de metabolitos secundários como cumarinas, terpenóides, esteroides e alcaloides, que foram positivos e alguns negativos na caracterização metabolismo secundários do extrato etanólico das folhas. Com a presença de metabólitos secundários, foi sinalizado o potencial para atividade antioxidante (ZUANAZZI, 2001; BOROSKI *et al.*, 2015), e os outros testes de atividades biológicos.

A caracterização dos metabolitos 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). A reação de cumarinas está mostrando na **Figura 11**.

FIGURA 8: Reação de identificação de cumarinas.



Fonte: Wolf, 2008.

Deste método a caracterização dos 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 (Alves *et al.*, 2000). As cumarinas também podem ter atividades antimicrobiana, antiviral, anti-inflamatória, antiespasmódica e antitumoral (MACHADO *et al.*, 2001).

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. O terpenóides são as classes estruturalmente mais variadas de produtos vegetais naturais (VIZZOTTO, 2010). Visando que esses compostos são isolados consideravelmente e vem sendo utilizados na indústria de flavorizantes, perfumes e outras atividades biológicas relacionados com as atividades terapêuticas.

Baseado nos resultados obtidos 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-inflamatórias e antibacteriana (RODRIGUES, 2010); OLIVEIRA, 2016).

Os triterpenos são uma classe mais estruturalmente diversificada (DOMINGO, 2009). Os esteroides são utilizados em alguns fármacos (OLIVEIRA, 2016).

A presente pesquisa verificou se no extrato do alho houvesse a presença dos alcaloides. Tendo-se observado uma leve formação de precipitado nos tubos analisados na cor laranja, com reagente de Dragendorff e Mayer.

Os alcaloides podem ser encontrados nos bulbos e folhas da espécie vegetal. 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).

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 da planta vegetal *Allium sativum* L., principais grupos metabólitos secundários presentes no teste foram: cumarinas, terpenóides, esteróides e alcalóides. A partir deste ensaio foi possível estabelecer algumas estratégias na obtenção de compostos isolados no extrato da planta e outras atividades biológicas.

5.3 Teste da toxicidade frente as larvas *Artemia salina*

Os resultados obtidos dos testes de toxicidades dos extratos etanólicos das folhas e alho frente a *Artemia salina* estão mostrados nas **Tabelas 4 e 5** e nos **Gráficos 01 e 02**.

Tabela 4. Resultado do teste toxicidade do extrato etanólico das folhas do (*Allium sativum* L.) frente a *Artemia salina*.

Concentração (ppm)	Total larvas	Larvas mortos	% mortalidade	DL ₅₀ (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	

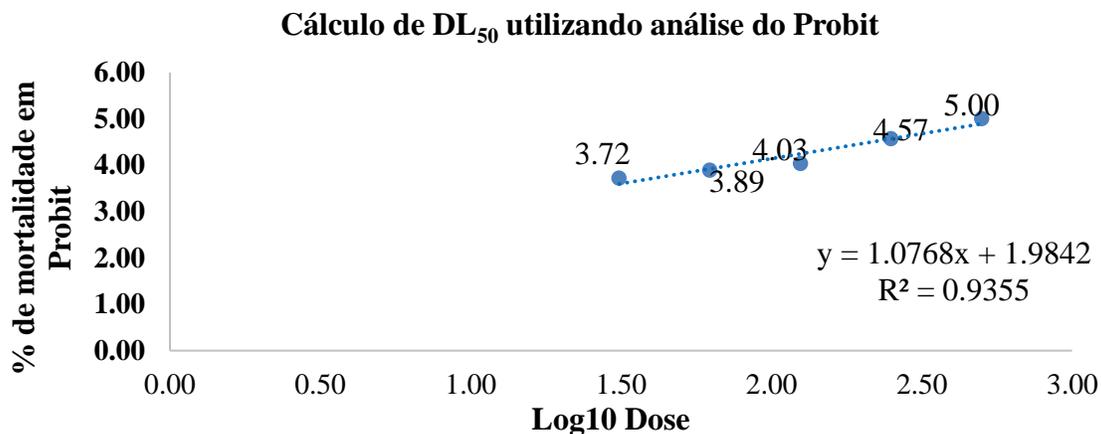
Fonte: Autor, 2017.

Tabela 5. Resultado do teste toxicidade do extrato etanólico dos Bulbos do (*Allium sativum* L.) frente da *Artemia salina*.

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

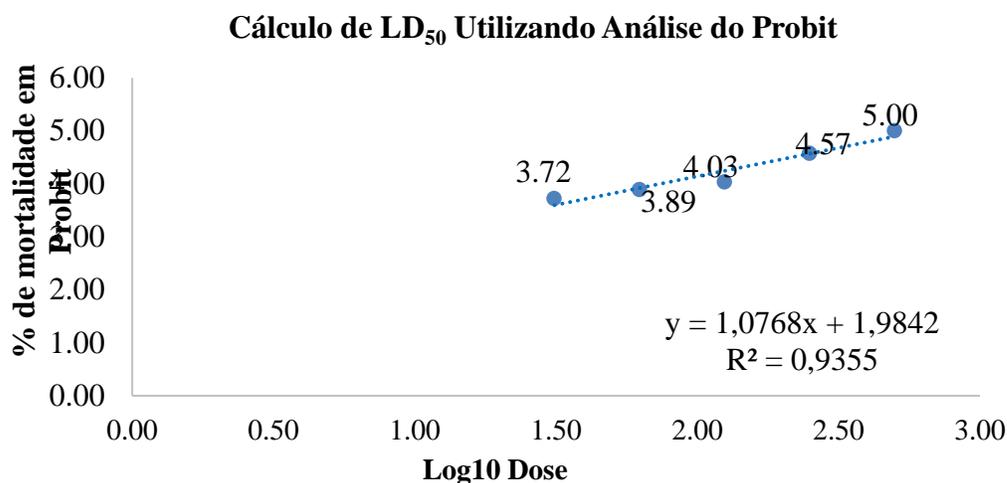
Fonte: Autor, 2017.

Gráfico 01. Porcentagem da analisado da mortalidade da *Artemia salina* do extrato etanólico das folhas do (*Allium sativum* L.) utilizando programa do Probit.



Fonte: Autor, 2017

Gráfico 02. Porcentagem analisado da mortalidade da *Artemia salina* do extrato etanólico dos bulbos do (*Allium sativum* L.) utilizando programa do Probit.



Fonte: Autor, 2017

Substâncias que podem apresentar toxicidade variam amplamente tanto em relação a estrutura como em propriedades químicas (SIMÕES et al., 2004). O segundo Bednarczuk *et al.*, (2010) a *Artemia 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 (DL₅₀).

Através dos resultados obtidos do ensaio dos náuplios (larvas) da *Artemia salina*, foram feitas a avaliação de toxicidades do alho e das folhas. O resultado mostrado na tabela, e DL₅₀ do alho apresentou-se maior toxicidade no alho que as folhas. Os dados foram processados e analisados pelo programa do Probit Analysis. O menor DL₅₀ considerando como maior toxicidades enquanto maior DL₅₀ é considera como menor toxicidades.

Dentro deste teste os resultados obtidos das toxicidades dos extratos etanólico dos bulbos e das folhas da espécie (*Allium sativum* L.) apresentaram-se o bom resultado durante a pesquisa. Os extratos das folhas apresentaram uma dose letal (DL₅₀) de 631,255 ppm, e o extrato dos bulbos com a dose letal (DL₅₀) de 39,355 pmm. Na análise uma menor DL₅₀ apresenta toxicidade, enquanto maior DL₅₀ apresenta menos toxicidade, como mostra nas **Tabelas 4-5** e nos **Gráfico 1-2**. Através dos resultados obtidos o extrato etanólico do alho apresentou-se mais

tóxico do que das folhas. Segundo Rivlin (2001), o alho é utilizado de forma medicinal, como tempero e como alimento há mais de cinco mil anos, sendo um dos primeiros fitoterápicos já registrados.

Baseado nos resultados da porcentagem da mortalidade da *Artemia salina*, calculado pelo programa Probit Análisis. O grau de toxicidades foi afirmado por Amarante *et al.*, (2011) que quando o $DL_{50} < 100$ então isso mostrou-se que Altamente toxicidades, quando DL_{50} 100 a 500 isso mostrou-se que Moderadamente toxico e quando $DL_{50} > 500$ mostrou-se que baixa toxicidades. Então baseando com a teste da *Artemia salina* percebeu-se que o extrato etanólico do alho foi apresentou-se altamente tóxico e o extrato etanólico das folhas foi apresentou-se baixa toxicidade.

Através do ensaio de toxicidade frente aos náuplios de *Artemia salina*, foi possível identificação os extratos do vegetal que possuem maior ou menor toxicidade.

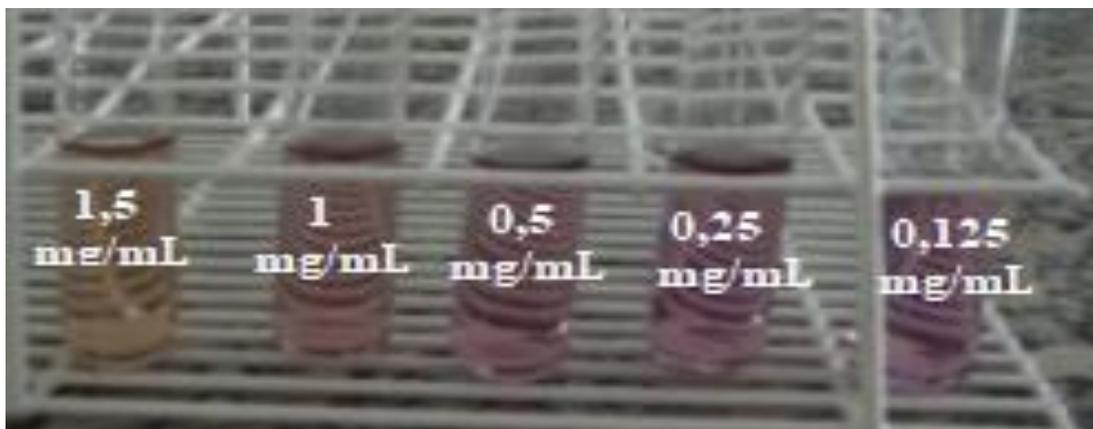
5.4 Avaliação de Potencial Antioxidante

O ácido ascórbico é uma estrutura que contém a vitamina C, então na avaliação antioxidante, onde foi utilizado o ensaio de sequestro de radicais livres de DPPH ela foi usada como padrão positivo. Podem ser usados também o tocoferol, tióis ou compostos fenólicos, sendo estes os mais comumente empregados na indústria alimentícia (FENNEMA *et al.*, 2010).

Os resultados obtidos no teste antioxidante do extrato etanólico das folhas e do alho estão apresentados nas **Tabelas 6-7; Gráficos 03-04 e nas figuras 9-10**.

As quantidades do extrato e frações da planta testada necessária para reduzir a concentração inicial de DPPH em 50% (CI_{50}) estão apresentadas nas **Tabelas 6-7**. Ver também a mudança de coloração nas **Figuras 9-10**. A capacidade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH foi estatisticamente comparável ao ácido ascórbico, o que denota o potencial antioxidante desta fração (PAULA, *et al.*, 2014).

Figura 9. Avaliação Potencial Atividade antioxidante do extrato etanólico das folhas *Allium sativum* L. avaliado pelo método de DPPH.



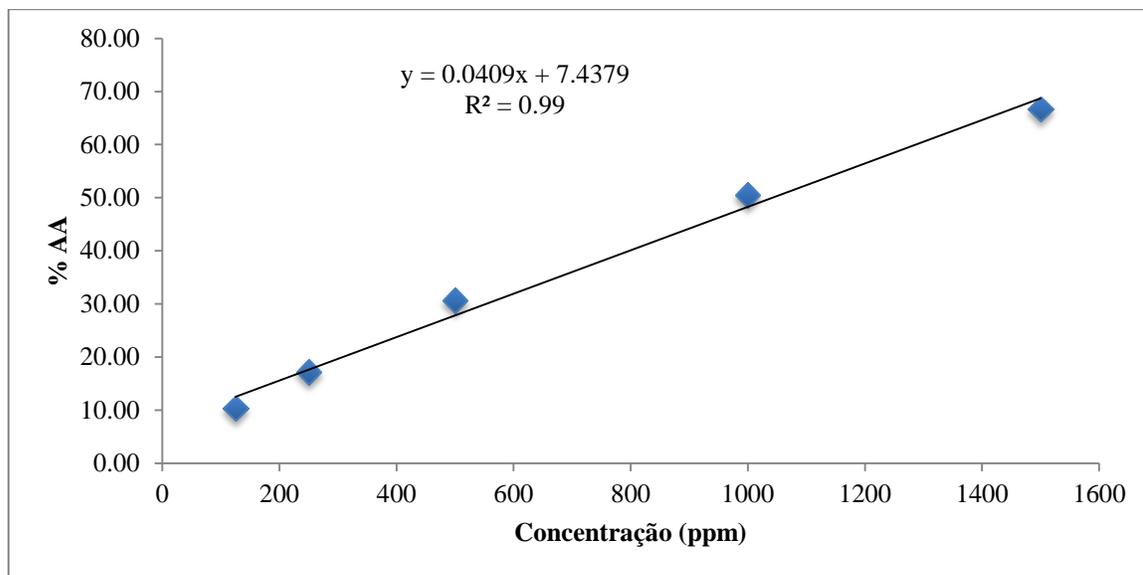
Fonte: Autor, 2017

Tabela 6. Avaliação Potencial Antioxidante do extrato etanólico das folhas do (*Allium sativum* L.).

Concentração (ppm)	Abs ($\lambda = 520 \text{ nm}$)	%AA	r	IC ₅₀ (ppm)
1500	0,236	66,68	$\pm 0,001$	
1000	0,351	50,49	$\pm 0,039$	
500	0,492	30,56	$\pm 0,002$	1.041,6
250	0,587	17,16	$\pm 0,002$	
125	0,636	10,25	$\pm 0,003$	
DPPH	0,709	0	$\pm 0,000$	

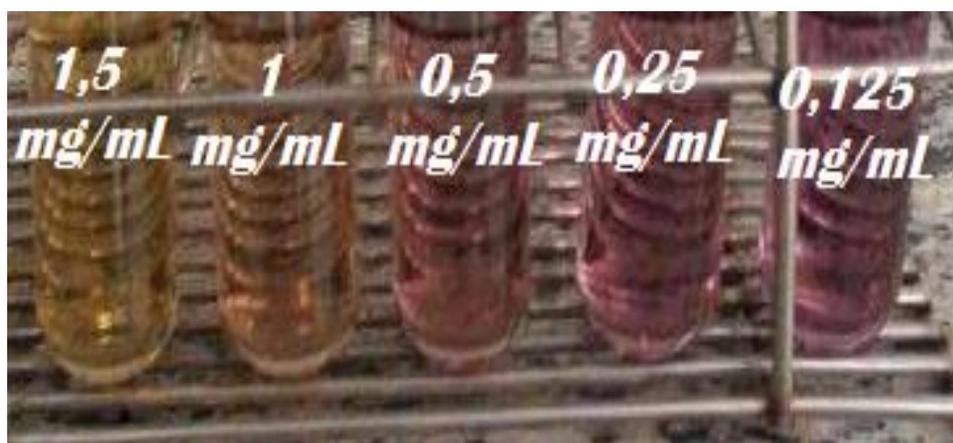
Fonte: Autor, 2017.

Gráfico 03. Porcentagem da inibição de Radical Livre DPPH do extrato etanólico das folhas de (*Allium sativum* L.)



Fonte: Autor, 2017.

Figura 10. Avaliação do Potencial de Atividade antioxidante do extrato etanólico dos bulbos do *Allium sativum* L. avaliado pelo método de DPPH.



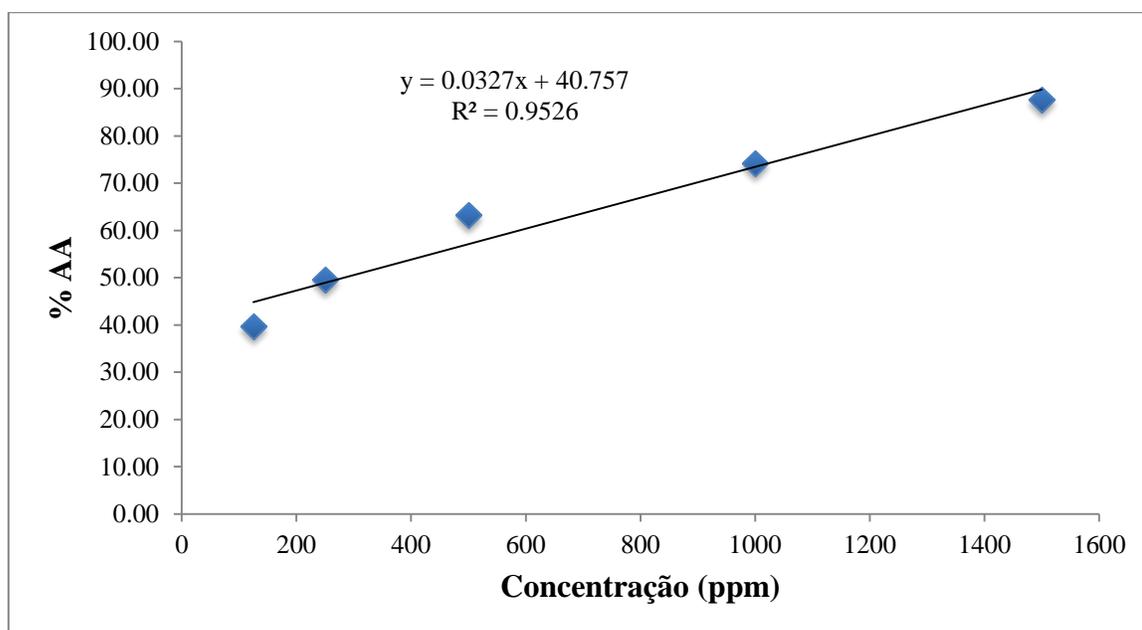
Fonte: Autor, 2017

Tabela 7: Avaliação Potencial Antioxidante do extrato etanólico dos bulbos do (*Allium sativum* L.).

Concentração (ppm)	Abs ($\lambda = 520 \text{ nm}$)	%AA	r	IC ₅₀ (ppm)
1500	0,054	87,65	$\pm 0,002$	282,6
1000	0,109	74,11	$\pm 0,001$	
500	0,155	63,18	$\pm 0,002$	
250	0,113	49,84	$\pm 0,002$	
125	0,254	39,67	$\pm 0,002$	
DPPH	0,421	0	$\pm 0,000$	

Fonte: Autor, 2017.

Gráfico 04: Porcentagem da inibição de Radical Livre DPPH do extrato etanólico dos bulbos do (*Allium sativum* L.)



Fonte: Autor, 20117

A partir da análise dos resultados obtidos, o extrato etanólico das folhas de *Allium sativum* L. 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 absorvância do DPPH, apresentado no espectro na região de 520 nm. Os resultados estão mostrados na **Tabela 6-7** e nos **Gráficos 03-04**, observou-se que, na concentração apresentou-se a porcentagem das folhas com inibitória de 66,677 %, e a porcentagem dos bulbos com inibitória de 87,648 %. O IC₅₀ foi calculado a partir da curva de regressão linear e equação da reta. O IC₅₀ representa a concentração do extrato necessária para inibir 50% do radical DPPH, no extrato etanólico das folhas apresentou seu IC₅₀ (1.041,6 ppm), e o extrato etanólico do alho apresentou o seu IC₅₀ (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.

6. CONCLUSÃO

O uso do alho (*Allium sativum* L.) apresentou resultados satisfatórios durante a pesquisa deste trabalho. Enquanto os processos da pesquisa foram verificados várias classes dos metabolitos secundários, avaliação potencial antioxidante e a toxicidades.

Análise da fitoquímica qualitativa preliminar apontou a presença de cumarinas, esteroides, terpenoides e alcaloides no extrato etanólico das folhas do alho *Allium sativum* L., entretanto relação com a pesquisa descobriu-se que a planta deve ser utilizada na medicina e o estudo poderá futuramente ter continuidade.

A avaliação antioxidante do extrato etanólico das folhas e dos bulbos da espécie do *Allium sativum* L., provavelmente mostrou-se moderada atividade nas folhas e nos bulbos mostrou-se uma maior atividade. Em relação à atividade antioxidante ativa, o trabalho precisa ser continuado para que seja feito o isolamento e purificação de metabólitos secundários possíveis de serem antioxidantes, e outras atividades biológicas, com prováveis aplicações na área alimentícia e medicinal.

O ensaio dos náuplios da *Artemia salina* da avaliação de toxicidade do alho e das folhas apresentou resultado satisfatório. Como as folhas apresentou-se baixas toxicidades e nos bulbos apresentou-se maiores toxicidades. A ausência de toxicidade estimula a realização de estudos adicionais na atividade biológica para a determinação de propriedades biológicas e terapêuticas desta espécie.

7. REFERÊNCIAS

- ABIB JUNIOR, E. Estudo clínico do alho fresco em voluntários sadios: avaliação da agregação plaquetária *in vitro* e *in vivo* e comportamento da pressão arterial através da MAPA *in vivo*. **Tese de Doutorado** (Clínica Médica) - Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 92p. 2004.
- Alves, T M.A.; Silva, A.F.; Brandão, M.; Grandi, T.S.M.; Smânia, E.F.A.; Smânia Jr., A.; Zani, C.L. 2000. **Biological screening of Brazilian medicinal plants**. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 95: 367-373.
- ALVES, C. Q.; DAVIS, J. M.; DAVIS, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Qui. Nova**, Vol. 33, No. 10, 2202-2210, 2010.
- ALMEIDA. J. M. D; *et al.*, **Avaliação da Atividade Antioxidante Utilizado Sistema β -Caroteno/Ácido Lineoléico e Método de Seqüestro de Radicais DPPH.**, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, São Paulo (SP). 2005.
- ALVARENGA, F.C.R; *et al.*, Avaliação da qualidade de amostras comerciais de folhas e tinturas de guaco. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.2a, p.442- 8, 2009.
- AMARANTE, C. B.; MULLER, A. H.; PÓVOA, M. M.; DOLABELA, M. F. **Estudo fitoquímico biomonitorado pelos ensaios de toxicidade frente à *Artemia salina* e de atividade antiplasmódica do caule de aninga (*Montrichardia linifera*)**. ACTA AMAZÔNICA. Vol. 41(3) 2011: 431-434.
- ANDRÉ, M. S. F. **Diagnose, Disseminação e Efeitos do complexo Viral do Alho (*Allium sativum* L.) Em Regiões Produtoras do Brasil**. Tese Doutorado em Fitopatologia. Brasília, 2010.
- BACELAR, P. A. A. **Caracterização citogenética em acessos de *Allium sativum* L.**, Teresina – PI, 2014.
- BEDNARCZUK, V. O; *et al.* Testes *in vitro* e *in vivo* utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão Acadêmica**, v.11, n.2, p.44, 2010

- BENKEBLIA, N. Free-Radical Scavenging Capacity and Antioxidant Properties of Some Selected Onions (*Allium cepa L.*) and Garlic (*Allium sativum L.*) Extracts. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, n.5, p.753-759, September 2005.
- BLOCK, E. **Garlic and Other Alliums: The Lore and the Science**. [S.l.]: Royal Society of Chemistry, 2010, 429p.
- BOROSKI, M.; VISENTAINER, J.V.; COTTICA, S.M.; MORAIS, D.R. **Antioxidantes: Princípios e Métodos Analíticas**. Editora; Appris. 1ª Ed. Curitiba – PR, 2015.
- BONTEMPO, M. **Alho: sabor e saúde**. São Paulo: Alaúde Editorial, 147p. 2007.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis Totais e Atividade Antioxidante de Cinco Plantas Mediciniais. **Quim. Nova**, Vol. 30, No. 2, 351-355, 2007.
- BREWSTER, J. L. Onions and other vegetable alliums. 2ª ed. Wallingford, UK: CABI International, 2008.
- CAMPOS, S. C. **Toxicidade de espécies vegetais**. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.373-382, 2016.
- 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; *et al.*, **Testes fitoquímicos em extratos foliares de *Oeceoclades maculata* Lindl. (Orchidaceae)**. Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.16, n.4, p.938-944, 2014.
- CAVALCANTE, A.A.C.M; *et al.*, **Compostos Fenólicos, Carotenos e Vitamina C na Atividade Antioxidante do Suco de Caju e da Cajuína**. In : Congresso de Pesquisa e Inovação da Rede Norte Nordeste de Educação Tecnológica, 1., 2006, Natal.
- COSTA, M. **Plantas Mediciniais no Ensino de Biologia do Timor Leste**. 2010. 103f. Dissertação (Mestrado em Educação em Ciências e Matemática) - Programa de Educação em Ciências e Matemática, Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2010.

COULTATE, T.P. **Alimentos: A química de seus componentes**. 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 368p.

CONCEIÇÃO, S. F. S. M. **Efeitos do Gengibre, do Alho e do Funcho na Saúde**. Universidade Fernando Pessoa. Porto. 2013.

COSTA- LOTUFO, L. V; MONTENEGRO, R. C; *et al.*, A Contribuição dos Produtos Naturais como Fonte de Novos Fármacos Anticâncer: Estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Rev. Virtual Quim.**, 2010, 2 (1), 47-58.

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.): porposta de metodologia alternativa. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 29(4): 793-797, 2009.

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.

DUZZIONI, A. G; *et al.*, **Determinação da Atividade Antioxidante e de Consstituintes Bioativos em Frutas Cítricas**. **Alim. Nutr.**, Araraquara v. 21, n. 4, p. 643-649, out./dez. 2010.

FENNEMA, O.R.; PARKIN, K.L.; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fennema**. 4ª ed. Ed. Artmed, 2010.

FERNANDES, O. L. G; FONSECA, A. M; *et al.*, Triagem fitoquímica e avaliação da atividade antioxidante do extrato etanólico da espécie *Plumeria rubra* L. na região do Maciço de Baturité-CE. Campina Grande, 2017

FIRMO, W. D. A; MENEZES, V. J. M; *et al.*, CONTEXTO HISTÓRICO, USO POPULAR E CONCEPÇÃO CIENTÍFICA SOBRE PLANTAS MEDICINAIS. **Cad. Pesq.**, São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011.

FRANÇA, I. S. X. de. *et al.*, **Medicina Popular: Benefícios e Malefícios das Plantas Medicinais**. Revista Brasileira de Enfermagem - REBEN, Brasília, v. 61, n. 2, p. 201-208, abr. 2008.

FRITSCH, R. M.; SALMAKI, Y.; ZARRE, S.; JOHARCHI, M. The genus *Allium* (Alliaceae) in Iran: Current state, new taxa and new records. **Rostaniha**, v. 7, 2006.

GALANTE, R. M. **Extração de Inulina do alho (*Allium sativum* L. var. Chonan) e simulação dos processos em batelada e em leito fixo**. Florianópolis, 2008.

- HARVEY, A. L. *et al.*, What can toxins tell us for drug discovery? **Toxicon**, v.36, n.11, p. 1635-40, 1998.
- HYACIENTH, D. C; ALMEIDA, S. M. S. Estudo fitoquímico, toxicidade em *Artemia salina* Leach e atividade antibacteriana de *Pseudoxandra cuspidata* Maas. **Biota Amazônia ISSN 2179-5746.**, Macapá, v. 5, n. 4, p. 4-7, 2015
- LEONÊZ, A. C. **Alho: Alimento e saúde.** Monografia Especialista em Gastronomia e Saúde. Universidade de Brasília. Brasília, 2008.
- LEME, L. M. **DETERMINAÇÃO DE ANTIOXIDANTES EM ALHO (*Allium sativum*, L.) UTILIZANDO ESPECTROSCOPIA E QUIMIOMETRIA.** Campo Mourão, 2015.
- LOZANO, A. F. Q.; BAGNE, L. **UMA ABORDAGEM DOS EFEITOS TERAPÊUTICOS DO *Allium sativum* (ALHO) NO SISTEMA IMUNOLÓGICO.** Revista Científica da FHO|UNIARARAS v. 3, n. 1/2015.
- MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental.** 3 ed. Edições UFC, Fortaleza, 2009.
- MARIUTTI, L.R.B.; BRAGAGNOLO, N. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.68, p.1-11, 2009.
- MACHADO, M; SOUSA, A; *et al.*, **O ALHO E A CEBOLA NA PREVENÇÃO DO CÂNCER.** Instituto Federal do Maranhão, 2010.
- MAGALHAES, L. **Os alimentos contra o câncer.** Petrópolis. Vozes, 2007.
- 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.
- MENEZES, J. F. S; FONSECA, A. M. *et al.*, Antioxidant Activity of Eu, Tb and Dy Complexes Against 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) free radical. **QUÍMICA NO BRASIL.** Volume. 09. Número 01 e 02. Jan.-Dez. de 2015.
- MENSOR, L.L.; MENEZES, F.S.; LEITÃO, G.G.; REIS, A.S.; SANTOS, T.C.dos; COUBE, C.S.; LEITÃO, S.G. Screening of brazilian plant extracts for antioxidante activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 127-130, 2001.

- MORAIS, C. da S.; LEME, L.M.; VALDERRAMA, P.; MARÇO, PH. Aplicação de calibração multivariada em dados de espectroscopia UV-Visível para previsão da acidez total em vinhos. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v. 6, p. 70–79, 2014.
- MORAIS, N. R. L; OLIVEIRA NETO, F. B; *et al.*, **Prospecção fitoquímica e avaliação do potencial antioxidante de *Cnidioscolus phyllacanthus* (müll. Arg.) Pax & k.hoffm. Oriundo de apodi – RN**. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, v.18, n.1, p.180-185, 2016.
- MOTA, J. H.; HOCE. R.; *et al.*, **Análise da evolução da produção e relação risco-retorno para a cultura do alho, no Brasil e na regiões (1991 a 2000)**. *Horticultras brasileira* 23:238-241. 2005.
- MOTA, J. H.; YURI, J. E.; RESENDE, G. M. Evolução da produção de alho no período de 2000 a 2010. **Revista Nosso Alho**. Distribuição gratuita da ANAPA, n. 15, p.41-43, 2012.
- NASCIMENTO J.E; MELO AFM; LIMA e SILVA T.C; Veras Filho J, Santos EM, Albuquerque UP, Amorim ELC. **Estudo fitoquímico e bioensaio toxicológico frente a larvas de *Artemia salina* Leach. de três espécies medicinais do gênero *Phyllanthus* (Phyllanthaceae)**. *Rev Ciênc Farm Básica Apl.* 2008; 29(2):145-50.
- NEVES L. C.; ALENCAR, S. M, CARPES, S.T. Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. **Braz. J. Food Technol.**, 2(15), 2009.
- OLIVEIRA, A. P. G.; OLIVEIRA, A. F. M.; *et al.* **ALHO (*Allium sativum* Linn.) COMO FITOTERÁPICO PARA ANIMAIS DE PRODUÇÃO**. Centro Científico Conhecer - Goiânia, v.11 n.22; p. 2015.
- 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** ISSN 2179-5746. 2016
- OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.1, p.36-44, 2015.
- ORLANDA, J. F. F; VALE, V. V. Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.17, n.4, supl. I, p.730-736, 2015.

PAULA, C. S.; VENDAM, M. C. S. *et al.*, Caracterização fitoquímica, toxicidade e avaliação preliminar da atividade antibacteriana das folhas de *Bauhinia unguolata* L. **Rev. Bras. Farm.** **96** (2): 1315 – 1334. Curitiba, 2015.

PAULA, C.S. CANTELI, V. D. D; *et al.*, Atividade antioxidante e toxicidade preliminar do extrato e frações obtidas das folhas e cascas do caule de *Dasyphyllum tomentosum* (Spreng.) Cabrera. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, v.16, n.2, p.189-195, 2014.

PEREIRA, V. R. **Ácido Ascórbico – características, mecanismos de atuação e aplicações na indústria de alimentos.** Pelotas, 2008.

PESSUTO. M. B. **Análise Fitoquímica de Extrato de Folhas *Maytenus ilicifolia* Mart. Ex Reiss e Avaliação do potencial Antioxidante.** Maringá, 2006.

PINTO. C. A.; **Produtos Naturais: Atualidade, Desafios e Perspectivas.** Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro 2002.

PINHEIRO, D. M.; PORTO, K. R. A.; MENEZES, M. E. S. A química dos alimentos: carboidratos, lipídeos, proteínas, vitaminas e minerais. **Conversando sobre Ciências em Alagoas.** Maceió: EDUFAL, 52p. 2005.

PONTE. F. L. R. **TOXICIDADE PRÉ-CLÍNICA DE FITOTERÁPICOS À BASE DE MEL DE ABELHA, PRÓPOLIS E EXTRATOS DE *Mikania glomerata*, *Eucalyptus globulus* OU DA ASSOCIAÇÃO *Zingiber officinale* E *Allium sativum* EM ROEDORES.** Dissertação submetida à Coordenação de Pós Graduação. Recife, 2003.

QUEROZ, Y. S. Efeitos do processamento do alho (*Allium sativum* L.) sobre os seus compostos bioativos e potencial antioxidante in vitro e in vivo. Tese pós-graduação. São Paulo, 2010.

RIVLIN, R. S. Historical perspective on the use of garlic. **The Journal of Nutrition**, v. 131, n. 3, p. p. 951–954, 200

RODRIGUES, K. A. F.; DIAS, C. N.; FLORÊNCIO, J. C.; VILANOVA, C. M.; GONÇALVES, J. R. S.; COUTINHO-MORAES, D. F. Prospecção fitoquímica e atividade moluscicida de folhas de *Momordica charantia* L. **Caderno de Pesquisa**, v. 17, p. 69-77, 2010.

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. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, p. 19-29, 2016.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; JIMÉNES, J. P.; CALIXTO, F. D. S. **Metodologia científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH**. Comunicado técnico online. Fortaleza, 2007.

SANTOS, N. C.; DIAS, C. N; *et al.*, Toxicidade e avaliação de atividade moluscicida de folhas de *Turnera ulmifolia* L. **R. bras. Bioci.**, Porto Alegre, v. 8, n. 4, p. 324-329, out./dez. 2010

SANTOS, F. C. C.; VOGEL, F. S. F.; MONTEIRO, S. G. Efeito do suco de alho (*Allium sativum* L.) sobre endoparasitas gastrintestinais de ovinos. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 6, n. 3, p. 176-181, 2011.

SCHULZ, V.; HÄNSEL, R.; TYLER, V. E. **Fitoterapia nacional – um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. Barueri-SP: Manoele, 406p. 2002.

SCIO, E. Cumarinas encontradas no gênero *Kielmeyera* - Família Clusiaceae. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.85, n.1, p.27-31, 2004.

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, jan.-abr. 2016. p. 381-388.

SILVA, A. A. **CARACTERIZACAO DE ORGANOSSULFURADOS EM DIFERENTES CULTIVARES DE ALHO (*Allium sativum* L.) E CEBOLA (*Allium cepa* L.)** Araraquara, 2009.

SILVA, J. M.; MOTTA, E. V. S.; MENDES, R. F.; SCIO, E. **Caracterização Fitoquímica, teor de fenóis e flavonoides e avaliação da capacidade antioxidante da folhas de *Lacistema pubescens* mart.** HU Revista, juiz de Fora, v. 37, n. 3, p. 347-352, 2012.

SIMÕES, C.M.O; *et al.* **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 5.ed. Florianopolis: Editora UFSC, 2004.1102p.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.;

- SUCUPIRA, N. R. **Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos**. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza-CE, 2012.
- TOMCZAM, M. REICHERT, S. **Estudo Fitoquímicos Adicionais com as Folhas e Cascas de *Alleurites molucana* L. (EUPHORBIACEAE)**. Itajaí (SC), 2013.
- VENNUCCHI, H.; ROCHA, M. M. **Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes Ácido ascórbico (Vitamina C)**. ILSI BRASIL. São Paulo. SP, 2012.
- VIEGAS JUNIOR, C; *et al.*, Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v.29, n.2, p.326-37, 2006.
- VINZZOTTO, M.; KROLOW, A. C; *et al.*, Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância. Pelotas – RS 2010.
- 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**. vol. 4, Issue 05, 2014. ISSN: 2231-6876.
- WANG, X.; LIU, R.; YANG, Y.; ZHANG, M. Isolation, purification and identification of antioxidants in an aqueous aged garlic extract. **Food Chemistry**, v.187, p. 37-43. 2015.
- WOLF, L. G. **Avaliação da qualidade físico-química de drogas vegetais**. 2008. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual de Maringá. Maringá, 2008.
- ZUANAZZI, J. A. S. **Flavonóides**. In: SIMÕES, C. M O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. (Orgs.) *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. 3 ed. Ed. Universidade/UFRGS / Ed. Da UFSC, Porto Alegre, 2001.
- ZAPAROLLI, M. R; NASCIMENTO, N. C; *et al.*, Alimentos funcionais no manejo da diabetes mellitus. **Revista Ciência & Saúde, Porto Alegre**, v. 6, n. 1, p. 12-17, jan./abr. 2013