
Avaliação da atividade antimicrobiana e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico do *allium sativum* (alho)

Cláudia Consuelo do Carmo Ota

Bióloga, professora, e doutoranda, Universidade Tuiuti do Paraná

Dayana Vieira Gomes da Silva

Biotecnólogos, Universidade Tuiuti do Paraná

Kelly Cristina Jacon

Biotecnólogos, Universidade Tuiuti do Paraná

Valter Baura

Biotecnólogos, Universidade Tuiuti do Paraná

Sérgio Nunes

Biotecnólogos, Universidade Tuiuti do Paraná

Resumo

O alho, *Allium sativum*, é da família da liliáceas e tem sido muito utilizado na medicina alternativa como chá ou até mesmo puro. Entre muitas ações benéficas descritas a ele, a ação antimicrobiana e anti-inflamatória estão entre as mais conhecidas. Por ser de uso popular, este trabalho teve como objetivo avaliar a ação antimicrobiana e anti-inflamatória do extrato hidroalcoólico do alho. Para os testes de ação antimicrobiana, foram usadas cepas de bactérias gram-negativa como *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), gram-positiva como *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e o fungo *Cândida albicans* (ATCC 10231), a escolha das mesmas foi baseado nas cepas exigidas como teste padrão pela Anvisa, para controle de qualidade. Para a avaliação anti-inflamatória foi realizado o teste de espraiamento de macrófagos, atividade fagocítica e retenção de lisossomos. O extrato hidroalcoólico de alho apresentou uma ação bacteriostática exceto para a cepa *Pseudomonas aeruginosa* e uma ação fungicida para *Candida albicans*. As doses de maior concentração apresentaram uma ação estimuladora do sistema imunológico.

Palavras-chave: Alho; antimicrobiano e anti-inflamatório.

Abstract

Garlic, *Allium sativum*, from liliaceous family has been widely used in alternative medicine as tea or even pure. Among many beneficial actions described to it antimicrobial and anti-inflammatory actions are the best known. Because of its popular use, this paper aims to evaluate the antimicrobial and anti-inflammatory of the hydroalcoholic garlic extract. To tests of antimicrobial activity strains of gram-negative bacteria such as *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) and *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), and gram-positive *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), and the fungus *Candida albicans* (ATCC 10231) the choice of these was based on the pattern as required by Anvisa, for quality control. Were used anti-inflammatory evaluation spreading of macrophages test, phagocytic activity and retention of lysosomes were done. The hydroalcoholic garlic extract showed a bacteriostatic action except for *Pseudomonas aeruginosa* strain and a fungicidal activity on *Candida albicans*. Doses that had a higher concentration caused an immune system stimulation.

Keywords: Garlic, antimicrobial and anti-inflammatory

Introdução

O alho, *Allium sativum*, é um antigo conhecido não apenas da culinária, mas também da medicina alternativa. É da família liliáceas e acredita-se que tenha origem asiática. (Bontempo, 2007; Costa, 1994).

Seu uso medicinal já era realizado cerca de 1500 a. C., quando os egípcios o indicavam em casos de cardiopatias, feridas, tumores, parasitoses e cefaléia (Charlab et. al., 2005). No século XIX, Pasteur relatou sua atividade antibacteriana. Alguns testes realizados *in vitro* e *in vivo* também apresentaram para o alho atividade antibacteriana, antimicótica, antiviral, antitumoral, antiflogística e fibrinolítica (Bontempo, 2007; Simões et al., 1999).

A atividade antibiótica do alho é atribuída principalmente à alicina, que age na destruição e inibição de bactérias gram-negativas. Uma pesquisa norte americana, citada por Bontempo, 2007, apresentou o resultado de inibição no crescimento de 14 espécies de bactérias utilizando uma diluição de extrato fresco de alho.

Em sua composição fitoquímica podemos encontrar: Alicina (di-propenyl tiosulfato é o principal componente do alho, muito volátil é responsável pela defesa do alho contra os microrganismos da terra) e tiosulfatos (antibiótica, antiviral e antifúngica), aliina

(hipotensor, hipoglicemiante), inulina, nicotinamida, galantamina, ácido fosfórico e sulfúrico, ajoeno (prevenção de coágulos, anti-inflamatório, vasodilatador, hipotensor e antibiótico), alil mercaptano, sulfeto dialil (hipocolesterolemiantes), adenosina (vasodilatadora, hipotensora, miorelaxante), Ffructano (cardioprotetora), escordinina (hipotensora, aumenta a utilização de B1 e antibacteriana), vitaminas A, B e C, proteínas e sais minerais. (Bontempo, 2007; Costa, 1994).

Assim o presente trabalho teve como objetivo testar a atividade antimicrobiana e antiinflamatória do extrato hidroalcoólico do alho (*Allium sativum*) *in vitro*.

Materiais e métodos

1. Extrato hidroalcoólico

Para produzir o extrato de alho foi adquirido, em mercado comum, o alho roxo, com a intenção de usar o alho mais comum nos domicílios. Foi feito uma seleção dos bulbos e a extração foi realizada pelo processo “A” descrito na farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil (1959), sendo usado como líquido extrator o álcool etílico a 70%. Em seguida o extrato foi deixado por 24h numa estufa com circulação de ar e numa temperatura controlada de 35°C, tal temperatura não altera a composição do extrato, porém foi suficiente para evaporar o líquido extrator.

2. Teste antimicrobiano e antifúngico

Foi usado o método de perfuração em ágar, (Ostrosky *et. al.*, 2008; Trabulsi & Alterthum, 2008) para testar cinco microorganismos (M.O.). Bactérias gram-negativas, *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), gram-positiva, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), e o fungo *Candida albicans* (ATCC 10231). Antes da sua utilização as cepas selecionadas foram inoculadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion, Difco) e incubadas à temperatura de 35°C por 24 horas para as bactérias e à 30°C para o fungo, posteriormente foi realizado uma diluição usando como padrão a escala Macfarland. Todos os materiais foram adquiridos da empresa Newprov, sito Pinhais, Paraná. O teste foi realizado com 5 diluições do extrato em soro fisiológico sendo a dose I de 0,5µL de extrato em 99,5µL de soro fisiológico, dose II 5µL em 95µL, dose III de 50µL em 50µL, dose IV 75µL em 25µL e dose V o extrato “puro”, e como controle foi usado penicilina 10.000UI/mL conjugada com estreptomicina 10mg/mL para os testes com bactérias e para testes com o fungo foi anfotericina b + tetraciclina. Estes testes foram realizados em quadruplicatas com 3 repetições em ágar mueller hinton.

Para a avaliação dos testes foi considerado, em caso positivo, a medida do halo, obtendo dois valores: a

medida maior e a menor, já que um halo não apresenta uma circunferência perfeita. Com os dois valores foi aplicado a fórmula: $Área = \pi.r^2$, onde π tem o valor de 3,14 e o raio equivale a metade de um círculo perfeito, porém conforme comentado anteriormente os halos não apresentam um círculo perfeito sendo portando r^2 substituído por *valor da medida maior vezes valor da medida menor*, como usado no trabalho apresentado por Prata et. al. (1988) e Menezes et. al. (2008).

3. Testes anti-inflamatório

Para o teste anti-inflamatório foram usadas as seguintes doses, dose I de 0,5µL extrato em 999,5µL de soro fisiológico, dose II de 50µL em 950µL, dose III de 500µL em 500µL e dose IV sendo o extrato “puro”. Como controle negativo foi usado somente células sem estímulos em solução tampão fosfato (Solution Buffer Phosphate – PBS).

Os testes realizados foram: fagocitose, retenção de lisossomos e espraçamento de macrófagos.

3.1 Obtenção das células

O fluido peritoneal é o líquido retirado após a lavagem da cavidade peritoneal com PBS, as células obtidas nestes ensaios foram retiradas de duas espécies

de roedores, ratos Wistar e camundongos Swiss, com peso médio de 280g e 25g, respectivamente. Para obtenção deste fluido foi usado o protocolo original do trabalho de Alan M Stall em Leon and Lenore Herzenberg's Lab at Stanford, 1988.

3.1.1 Seleção dos Macrófagos

A seleção dos macrófagos foi realizada por adesão, processo que permite obter culturas em monocamada de células aderentes, das quais pelo menos 98% eram macrófagos. As células contidas no lavado peritoneal foram contadas na Câmara de Neubauer e centrifugadas a 850rpm durante 5 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensas em meio de cultura, de forma atingir a concentração desejada para cada experimento (Piemonte & Buchi, 2001).

3.2 Espraçamento de macrófagos

Para o espraçamento de macrófagos foi usado o método descrito por Sampaio *et. al.*, 2001. Esse experimento foi realizado em triplicata. Após a adesão do macrófago na lamínula contida em cada um dos seis poços das placas, foram adicionado, juntamente com o meio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), 10µL das doses de alho (I, II, III e IV) e dois

poços mantiveram-se apenas os macrófagos aderidos sem estimulação. A placa foi incubada por 1 hora no escuro. Posteriormente os poços foram lavados e os macrófagos fixados pela primeira vez em álcool 70%, após as lâminulas foram lavadas com PBS e coradas com Giemsa e os macrófagos fixados novamente em acetona mais xilol para o processo de montagem da lâmina permanente.

Uma vez as lâminas prontas essas foram lidas em microscópio óptico em aumento de 400x realizando uma contagem total de 500 células. Para calcular a porcentagem de espriamento foi realizado o seguinte cálculo:

$$\frac{\%ET - \%EC}{\%EC} \times 100$$

%EC

Sendo:

%ET = porcentagem de espriamento do grupo tratado.

%EC = porcentagem de espriamento do grupo controle (Peres e Curi, 2005).

3.3 Fagocitose

Foi utilizado o método descrito por Pipe et al. (1995). Sendo depositados 100 µL da solução de macrófagos, com concentração 2×10^6 células, em placa

de ELISA após foram adicionados 10 µL das doses de extrato e incubado por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 10 µL de zimosan ($2,3 \times 10^8$ partículas/mL) corado com vermelho neutro e incubado por mais 30 minutos. Após este procedimento, foram adicionados 100 µL de fixador para interromper o processo de fagocitose e, 30 minutos depois a placa foi lavada com PBS e, posteriormente, centrifugadas, por 5 minutos a 1.500 rpm, a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitado pelos macrófagos. O vermelho neutro no interior dos macrófagos foi solubilizado utilizando 100 µL de solução de extração. Após 30 minutos foi realizada a leitura das placas, a 550 nm utilizando leitora de ELISA.

Este teste foi realizado em duplicata para cada espécie com três repetições experimentais.

3.4 Retenção de lisossomos

Foi realizado de acordo o método descrito por Pipe et. al. (1995) da seguinte forma: Em 100µL da solução peritoneal com concentração de 2×10^6 foram adicionados 10µL do controle e de cada dose, este foi incubado por 30 minutos. Em seguida foram adicionados 20µL de vermelho neutro e incubado novamente pelo mesmo tempo, após foi centrifugado e as células lavadas com solução de PBS, três vezes,

sendo na última vez adicionado solução de extração para solubilizar o vermelho neutro que estava dentro dos lisossomos. Isto é possível porque o vermelho neutro é um corante catiônico que se difunde através da membrana celular assim ficando aprisionado no lisossomo devido à mudança de cargas causadas pelo pH ácido do sistema lisossomal. Por fim foi incubado novamente por mais 30 minutos e posteriormente procedeu a leitura em ELISA no comprimento de onda de 490nm.

Este teste foi realizado em quadruplicata para cada espécie com três repetições experimentais.

3.5 Análise estatística

Os dados foram expressos como média \pm epm (erro padrão da média) dos grupos estudados. As comparações entre os grupos foram realizadas empregando-se one way-ANOVA com pós teste de Tukey, com nível de significância para $p < 0,05$.

Resultados e discussão

1. Características físico-química do extrato

Para a produção do extrato foram usados 200g de alho triturado que após 72h de extração em funil

apresentou rendimento de 160,35g de extrato de alho mais álcool 70%.

Após 160,35g serem colocados em estufa para uma secagem foi obtido o material com 48,82g ou seja 30,45% de rendimento do peso inicial. Esse material continuava na forma líquida, porém com uma alta viscosidade e um pH 5,53. Para facilitar o manuseio durante os experimentos, o material foi solubilizado em 20mL de soro fisiológico passando a ser menos viscoso, com pH 6,0 e um peso final de 65,32g.

O produto final foi dividido em três vidros âmbar para evitar a degradação pela luz e esses foram armazenados a -10°C .

Não houve a necessidade da correção dos pHs durante a preparação das doses pois apresentaram um pH entre 6,0 e 7,0.

2. Teste antimicrobiano e antifúngico

Os resultados foram coletados com 24h após incubação das placas, sendo analisada a presença ou não de halo (Tabela 1). A tabela 1 mostra que a dose I não apresentou efeito sobre os microorganismos (M.O.), este fato pode ser atribuído a uma pequena concentração do extrato. Para a dose II o efeito foi maior como fungicida, porém houve um efeito

discreto como bacteriostático sobre as cepas de *Salmonella typhimurium*.

A cepa *Salmonella typhimurium* se apresentou mais sensível às doses III, IV e V, obtendo na dose V um resultado de aproximadamente o dobro de eficácia quando comparado ao controle. Similarmente a dose V apresentou maior eficácia para a cepa *Staphylococcus aureus* de 37% e 24% para a *Cândida albicans* quando comparado ao controle.

As doses III, IV e V também apresentaram efeitos para as cepas *Pseudomonas aeruginosa* e para *Escherichia coli* porém os halos não foram significativos como o controle, sendo que a dose V apresentou apenas 29% e 38%, respectivamente, do resultado que o controle apresentou.

Deste modo a dose V pode ser considerada como fungicida bem como bacteriostático, não podendo ser considerada como bactericida pois após 72h de incubação a 35°C todos os halos formados pelo extrato hidroalcoólico de alho não se mantiveram, sugerindo assim que não houve uma inibição da formação de membrana citoplasmática ou da parede celular, o que pode ter ocorrido é que o extrato tenha mantido a bactéria retida em uma dada fase do ciclo com impedimento de que a mesma prossiga a divisão celular. Já o halo do controle permaneceu após as 72h de incubação como demonstra as figuras 1 e 2.

Apenas as placas de *Cândida albicans* mantiveram os halos das doses após 72h de incubação como os

Tabela 1. Médias calculadas em centímetros após 24h de incubação das placas a 35°C.

M.O./Dose	0	I	II	III	IV	V
<i>Staphylococcus aureus</i>	20,82	0,00	0,00	12,28	18,84	28,57
<i>Salmonella typhimurium</i>	22,79	0,00	5,43	30,43	36,30	40,13
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24,39	0,00	0,00	3,80	5,79	7,10
<i>Escherichia coli</i>	23,67	0,00	0,00	6,72	7,79	9,07
<i>Candida albicans</i>	32,15	0,00	13,10	33,24	34,78	40,08

FIGURA 1: Placa de *Escherichia coli* após 24h de incubação, onde pode ser notado a diferença de tons nos locais em que houve o crescimento do m.o. e naqueles em que este foi inibido. Indicado pelas flechas contínuas.

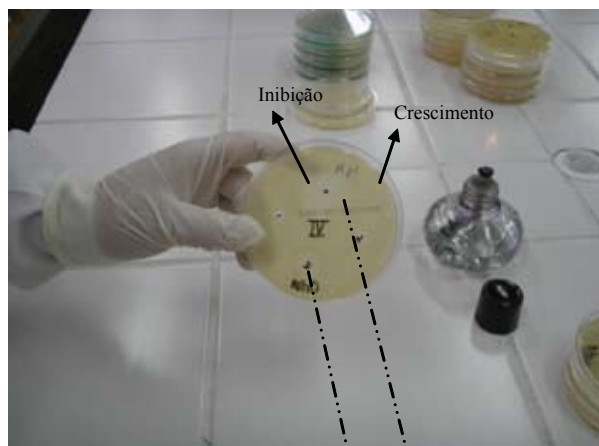
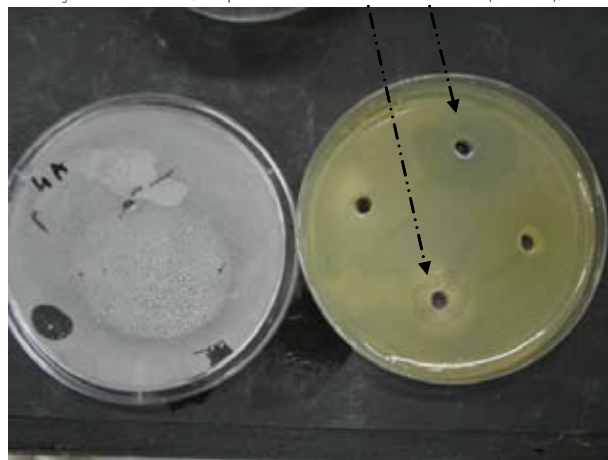


FIGURA 2, indicado pelas flechas pontilhadas, após 72 horas de incubação percebe-se que no halo acima, halo do controle, continua uma diferença na tonalidade, ou seja a inibição foi mantida, o que não ocorre no halo abaixo (dose III), ou seja a inibição de crescimento não foi mantida.



halos dos controles, deste modo o extrato pode ser considerado com ação fungicida a partir da dose II, sendo crescente para as demais doses.

Packer, 2007, no trabalho que realizou com óleo de alho não obteve halo para as cepas *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans* diferente do obtido no trabalho atual. Esse resultado pode ser atribuído a dificuldade que o óleo (característica apolar) tem em se difundir pelo meio de cultura (característica polar).

3. Testes anti-inflamatório

3.1 Espraiamento de macrófagos

Foi contado um total de 500 células por lâmina e calculado conforme Peres e Curi, 2005, sendo o valor expresso em porcentagem de macrófagos espriados (tabela 2):

Tabela 2. Porcentagem de espriamento na presença das diferentes doses de extrato hidroalcoólico de alho. Esse teste foi realizado apenas com células peritoneais de camundongo. No cálculo foi considerado como 100% o número de macrófagos espriados no controle.

Média dos testes realizados em triplicata	
Macrófagos	3,87%
Dose I	-7,75%
Dose II	287,59%
Dose III	1165,37%
Dose IV	1191,99%

O controle, identificado como macrófago na tabela, possui 3,87% de espriamento dos macrófagos enquanto que a dose I possui -7,75% de espriamento quando comparado com o controle. O valor negativo mostra um efeito discreto da dose I como anti-inflamatório, porém não significativo. As doses II, III e IV apresentaram um aumento de 287,59%, 1165,37% e 1191,99%, respectivamente, de espriamento dos macrófagos em relação ao controle, portanto as doses II, III e IV podem ser consideradas como estimuladoras de espriamento, ou seja, imunomoduladora.

3.2 Fagocitose

No gráfico 1 podemos observar que as doses I e II não apresentam diferenças significativas entre si, mas são diferentes do controle (macrófago) havendo uma diminuição na atividade fagocítica indicando um

discreto efeito anti-inflamatório. Porém as doses III e IV apresentaram a mesma ação, mas diferem das doses I e II e do controle, apresentando um aumento na atividade fagocítica indicando uma estimulação imunológica.

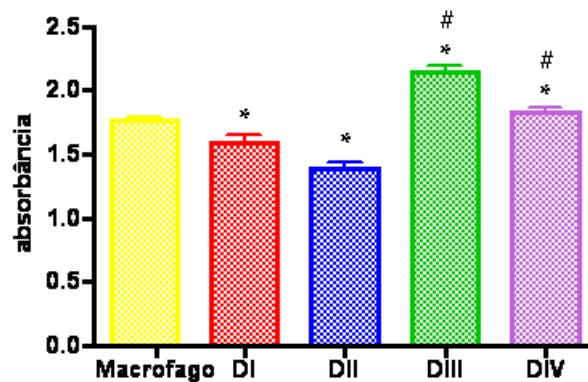


Gráfico 1. Análise da atividade fagocítica em células peritoneais de rato Wistar realizada em quadruplicata com três repetições experimentais. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. # $p < 0,05$ quando comparado as doses I e II.

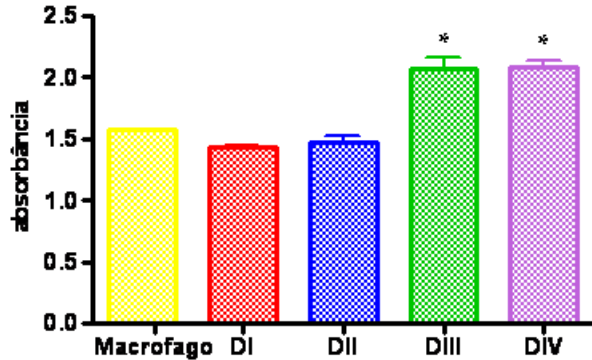


Gráfico 2. Análise da atividade fagocítica em células peritoneiais de camundongo Swiss realizada em quadruplicata com três repetições experimentais. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle e as doses I e II.

Analisando o gráfico 2, observa-se que o grupo controle apresentou resposta igual às doses I e II, apresentando diferença significativa quando comparado às doses III e IV que apresentaram um aumento na atividade fagocítica indicando uma estimulação imunológica.

Portanto as doses III e IV podem ser consideradas imunomoduladoras para fagocitose.

3.3 Retenção de lisossomos

No gráfico 3 é possível verificar o aumento gradativo na retenção de lisossomos de acordo com as doses. As doses III e IV são iguais entre si e diferentes das doses I, II e controle que também são diferentes

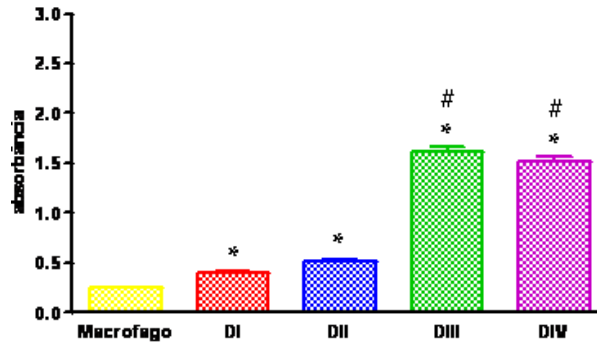


Gráfico 3. Análise da retenção de lisossomos em células peritoneiais de rato realizada em duplicata com três repetições experimentais. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle. # $p < 0,05$ quando comparado a dose I e II.

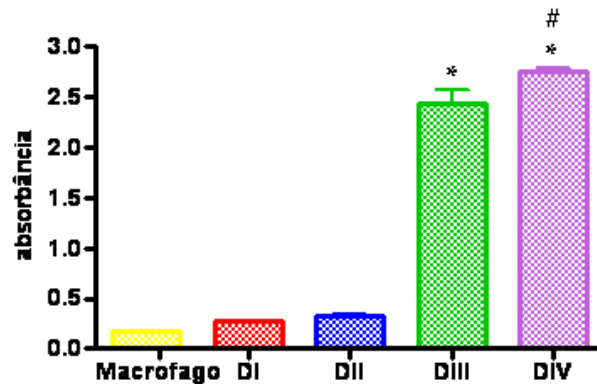


Gráfico 4. Análise da retenção de lisossomos em células peritoneiais de camundongo realizada em duplicata com três repetições experimentais. * $p < 0,05$ quando comparado ao controle e as doses I e II. # $p < 0,05$ quando comparado a dose III.

entre si. As quatro doses do extrato obtiveram um efeito estimulador do sistema imunológico uma vez que houve um aumento significativo de lisossomos quando comparados ao controle.

No gráfico 4 todas as doses apresentaram um aumento de retenção de lisossomos porém as doses I e II não apresentam diferenças significativas quando comparados ao controle. Já as doses III e IV são diferentes entre si apresentando um aumento significativo na retenção de lisossomos.

As doses III e IV incentivaram a produção de lisossomos podendo assim considerar essas doses como estimuladoras do sistema imunológico.

Conclusão

Concluimos que nas dosagens testadas para os microorganismos *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* o extrato hidroalcoólico do alho apresenta uma

característica biostática, ou seja, não promove alterações irreversivelmente letais aos microorganismos testados, como os controles apresentaram, mas mantém o microorganismo retido numa dada fase do ciclo celular impedindo a divisão celular por um dado tempo, já que após 72 horas de incubação os m.o. testados voltaram a crescer onde com 24 horas havia halo.

Já para a *Candida albicans* todos os testes nas quatro doses apresentaram halo (dose II, III, IV e V) que foi mantido, o que indica que para este microorganismo o extrato hidroalcoólico do alho apresentou uma ação biocida, ou no caso, fungicida.

Para a avaliação anti-inflamatória o extrato hidroalcoólico do alho apresentou uma ação estimuladora do sistema imunológico, ao contrário do que ocorre em caso de anti-inflamatórios. Essa estimulação causada pelo extrato hidroalcoólico do alho pode ser o real motivo de uma recuperação em algumas doenças, fato confundido no uso popular como ação anti-inflamatória.

Referências

- BONTEMPO, M. *Albo, sabor e saúde*. São Paulo: Alaúde, 2007.
- COSTA, A. F. *Farmacognosia*. 4ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.
- CHARLAB, S. et. al. *A cura pela comida*. Rio de Janeiro: Reader's Digest Brasil Ltda, 2005.
- Farmacopéia dos Estados Unidos do Brasil*. São Paulo: Indústria Gráfica Siqueira S.A., 2ª ed., 1959. p.448.
- MENEZES, F. et. al. Avaliação clínica e aspectos histopatológicos de feridas cutâneas de cães tratadas com curativo temporário de pele. *PUBVET*, vol. 2. n° 4, Jan, 2008.
- OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M., NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, n° 2, Abril/Junho, p 301-307, 2008.
- PACKER, J. F. e LUZ, M. M. S. Método para a avaliação da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, vol. 17. n° 1, Jan./Mar., p 102-107, 2007.
- PERES, C. M.; CURI, R. *Como cultivar células*. 1ª ed. Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 2005. cap. 26, p. 153-165.
- PIPE, R. K., COLES, J. A., FARLEY, S. R. *Assays for measuring immune response in the mussel Mytilus edulis*. Tech. Fish Immunol., 1995.
- PRATA, M., HADDAD, C., GOLDENBERG, S., et al. Uso tópico do açúcar em ferida cutânea. Estudo experimental em ratos. *Acta Cirúrgica Brasileira*, vol. 3, n° 2, p. 43-48, 1988.
- SAMPAIO, S. C.; SOUZA-E-SILVA, M. C. C.; BORELLI, P.; CURI, R.; CURY, Y. Crotalus durissus terrificus snake venom regulates macrophage metabolism nad function. *J. Lukoc. Biol.*, 2001.
- SIMÕES, A. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. e PETROVICK, P. R. *Farmacognosia, da planta ao medicamento*. Rio Grande do Sul: Editora da Universidade, 4ª ed. 1999.
- TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. et. al. *Microbiologia*. São Paulo: Atheneu, 5ª ed., 2008. cap. 1, 93-102.