

# Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* do *Allium sativum* L.

Antibacterial activity *in vitro* of *Allium sativum* L.

DANIELE MARINS SANTIAGO  
VANESSA PEREIRA TOLENTINO FELÍCIO  
SANDRA SOARES

1. Formanda do curso de Farmácia, 2010, da Faculdade de Ciências da Saúde do Centro Universitário de Patos de Minas, sob a orientação da Prof.<sup>a</sup> Me. Vanessa Pereira Tolentino Felício e co-orientação da Professora Me. Sandra Soares.
2. Mestre em Promoção de Saúde, Professora do Curso de Farmácia do Centro Universitário de Patos de Minas – MG.
3. Mestre em Ciências, Professora do Curso de Farmácia do Centro Universitário de Patos de Minas – MG.

---

**Resumo:** O presente trabalho tem como objetivo realizar estudo da atividade antibacteriana do *Allium sativum* L. frente a cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas. Foram utilizados os bulbos frescos de *Allium sativum* L. *in natura*, extratos vegetais aquosos obtidos por três métodos (decoção, infusão e maceração), extratos hidroalcoólicos e cápsulas de óleo de alho de 250mg. Para a identificação dos metabólitos presentes no extrato de alho foi realizada uma análise farmacognóstica, na qual se pesquisou alcaloides, antraquinonas cumarinas, flavonoides, saponinas e taninos, seguindo-se as metodologias validadas para cada grupo. A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de difusão em ágar – técnica do poço frente a cepas padrão de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 14948) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). Verificou-se que apenas o alho *in natura* e o extrato hidroalcoólico apresentaram atividade antibacteriana ante os três microrganismos testados. Portanto, as preparações usualmente utilizadas pela população no tratamento de infecções, cápsula de óleo de alho e extratos aquosos mostraram-se ineficazes para este fim, no presente estudo. A partir da análise farmacognóstica, observou-se a presença de flavonoides (flavonas), taninos (hidrolisáveis), alcaloides e cumarinas no extrato hidroalcoólico, os quais podem estar contribuindo com a atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato do alho, uma vez que o potencial antimicrobiano de extratos vegetais, muitas vezes, não se deve à única substância, mas, sim, a um conjunto dessas.

**Palavras-chave:** Alho. Atividade antimicrobiana. Plantas medicinais.

**Abstract:** This paper aims at studying the antibacterial activity of *Allium sativum* L. against strains of Gram positive and Gram negative. We used the fresh bulbs of *Allium sativum* L.,

aqueous plant extracts obtained by three methods (decoction, infusion and maceration) and hydroalcoholic extracts of garlic oil capsules 250mg. In order to identify the metabolites present in the extract of garlic there was a pharmacognostic analysis in which alkaloids, anthraquinones coumarins, flavonoids, saponins and tannins were researched, followed by the validated methodologies for each group. Antimicrobial activity was evaluated by agar diffusion method – well technique compared to standard strains of *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 14948) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). It was found that only the fresh garlic and hydroalcoholic extract showed antibacterial activity against the three microorganisms tested. Therefore, the preparations usually used by people to treat infections, capsule of garlic oil and extracts, it proved ineffective for this purpose, in this study. From the pharmacognostic analysis, we observed the presence of flavonoids (flavones), tannins (hydrolyzable), alkaloids and coumarins in hydroalcoholic, which may be contributing to the antimicrobial activity displayed by the extract of garlic, once the potential antimicrobial plant extracts is not due to a single substance, but rather to a set of these.

**Keywords:** Garlic. Antimicrobial activity. Medicinal plants.

## 1. Introdução

Plantas medicinais e produtos fitoterápicos têm sido grandemente utilizados na medicina popular para o tratamento de uma grande variedade de doenças, principalmente devido ao alto custo dos medicamentos industrializados (GAZOLA; SINGI; RESENDE, 2002). De acordo com a OMS, grande parte da população dos países em desenvolvimento utiliza em larga escala plantas para o tratamento de diversas patologias. No Brasil, apenas 20% da população utiliza medicamentos alopáticos, o restante encontra nos medicamentos fitoterápicos uma fonte alternativa de medicação (FOGLIO *et al.*, 2006). Além disso, as plantas medicinais apresentam grande importância para a indústria farmacêutica, visto que, a partir delas muitos medicamentos são sintetizados (MASHOUR *et al.*, 1998 *apud* SINGI *et al.*, 2006).

Até o final do século XIX, quando a síntese química de medicamentos teve início, as plantas medicinais e seus derivados constituíam a base da terapêutica. Todavia, apesar de a medicina tradicional utilizar plantas como principal fonte medicamentosa, apenas 25% dos medicamentos prescritos atualmente é de origem vegetal, isolados ou produzidos por semissíntese (FOGLIO *et al.*, 2006).

Entretanto, de acordo com Foglio *et al.* (2006) o interesse em fitoterapia tem ressurgido nos últimos anos, e o número de publicações dessa linha de pesquisa tem crescido. Isto se deve principalmente à grande eficácia de algumas substâncias extraídas de plantas contra algumas patologias e à complexidade requerida na descoberta de novas drogas por síntese química, as quais necessitam de sete a dez anos para seu desenvolvimento completo. Além disso, a megabiodiversidade existente em alguns países, importante no desenvolvimento de novas drogas de origem vegetal, justificaria a conservação destas áreas e a utilização das plantas de forma sustentável.

A busca por plantas com atividade antimicrobiana tem aumentando principalmente devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana, um fenômeno biológico natural, que se seguiu à introdução dos antimicrobianos na prática clínica, sendo a-

centuado pelo uso desmedido e irracional desses agentes. O ritmo do desenvolvimento de resistência microbiana constitui um grande desafio terapêutico e uma preocupação mundial, pois paralelamente ao seu aumento houve uma diminuição no desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas. Portanto, inúmeros trabalhos vêm sendo desenvolvidos em todo o mundo com intuito de identificar plantas ou substâncias com propriedades antimicrobianas, uma vez que as plantas produzem inúmeras substâncias biologicamente ativas, e muitos vegetais contêm compostos que são inibidores do crescimento de microrganismos, exercendo papel importante na resistência. Assim tem-se nos produtos de origem vegetal uma fonte importante de recursos (ROSSI; NADREAZZI, 2005).

O alho (*Allium sativum* L.) e seus extratos têm sido utilizados no tratamento de infecções ao longo da história (CUTLER; WILSON, 2004). Segundo Lorenzi e Matos (2002) o alho é uma erva bulbosa, anual, de porte baixo e cheiro forte e característico. Os bulbos encontram-se divididos em oito a doze bulbilhos. As folhas são lineares e extensas e as flores reunidas em umbela branca ou avermelhada longo-penduculada. O fruto consiste em um compartimento loculicida com uma a duas sementes em cada loja.

É conhecido por vários nomes diferentes, dependendo da região em que é produzido e consumido, sendo seus nomes mais comuns: alho-hortense, alho-manso e alho-do-reino. A maior concentração de fitoquímicos terapêuticos encontra-se nos bulbos, popularmente conhecidos como dentes de alho. O óleo essencial adquirido a partir do bulbo contém aproximadamente 53 constituintes, principalmente ajoeno, alicina e aliina, derivados orgânicos do enxofre, os quais conferem ao alho propriedades farmacológicas, dentre as quais se encontra a atividade antibacteriana (LORENZI; MATOS, 2002).

Com o uso popular do alho (*Allium sativum* L.) reconhecido pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) pela resolução número 10 de 09 de março de 2010 (BRASIL, 2010) e a grande procura pela descoberta de novos produtos naturais com atividade antimicrobiana, é de grande importância a realização de estudos que forneçam parâmetros mais precisos quanto ao real potencial antimicrobiano deste vegetal frente a microrganismos de referência. O presente trabalho tem como objetivo realizar estudo da atividade antimicrobiana do alho frente a cepas de bactérias Gram positivas e Gram negativas.

## **2. Revisão teórica**

### **2.1. Considerações gerais sobre a espécie**

Há uma discussão entre os botânicos relacionada à correta localização do gênero *Allium* em meio às famílias botânicas. Botânicos americanos consideram o gênero *Allium* pertencendo à família Amaryllidaceae, enquanto que os pesquisadores europeus o colocam na família Liliaceae. Alguns autores contemporâneos, baseados na grande quantidade de espécies bem diferenciadas deste gênero, acreditam que ele faça parte da família Alliaceae (SOUSA *et al.*, 2002). Entretanto, de acordo com Joly (1998), o

gênero *Allium* pertence à família Liliaceae, e tal classificação é a mais adotada atualmente.

A família Liliaceae consiste em uma das grandes famílias de monocotiledôneas e contém 220 gêneros e aproximadamente 3.500 espécies. Geralmente, as plantas que a constituem são herbáceas e apresentam caule subterrâneo bulboso ou bulboso superficial. As folhas são lanceoladas ou lanceoladas largas, podendo estar presentes apenas nas escamas do bulbo ou mesmo encontrarem-se suprimidas e então serem substituídas por filocládios. Na maioria das vezes, as flores são vistosas e o fruto seco (JOLY, 1998).

O alho (*Allium sativum* L.), também conhecido popularmente como alho-comum, alho-da-horta, alho-hortense e alho-manso (Índice Terapêutico Fitoterápico, 2008), é utilizado sob a forma de infusão, decocção, xarope e cataplasma. É uma planta herbácea e de porte baixo, que atinge 0,40 - 0,70m de altura. Tem folhas lanceoladas as quais formam o pseudocaule implantando-se em um caule pequeno e achatado. As gemas do caule formam os bulbilhos, que em conjunto formam o bulbo. Os bulbilhos têm morfologia ovoide-arqueada e encontram-se envolvidos por folhas protetoras de coloração branca arroxeada. O bulbo é arredondado, periforme e constituído por aproximadamente 5 a 20 bulbilhos. As raízes atingem 40 até 82 cm de profundidade e formam um sistema radicular fasciculado (VIEIRA, 2004 *apud* GALANTE, 2008).



**Figura 1.** Foto de folhas e bulbo alho (*Allium sativum* L.)

O alho é uma planta bienal; todavia, comporta-se como uma cultura anual a qual tem a bulbificação limitada pelo fotoperíodo e a temperatura. O fotoperíodo deve ser maior que o valor crítico da cultivar, se não a bulbificação pode não ocorrer. É exigente em frio por ser originário de regiões asiáticas de clima frio, necessitando de temperaturas amenas a mais baixas para que possa haver o desenvolvimento dos bulbos (SOUSA *et al.*, 2002). O solo deve encontrar-se bem destorrado e rico em matéria orgânica.

ca (ALMASSY JUNIOR *et al.*, 2005). Segundo Sousa *et al.* (2002) solos arenosos não têm capacidade suficiente de retenção da umidade e dos nutrientes, ao passo que solos muito argilosos deformam os bulbos. Devido à cultura ser conduzida em ambiente frio e o clima encontrar-se seco, a irrigação torna-se indispensável. A colheita, por sua vez, normalmente é realizada entre 110 a 150 dias após o plantio quando as folhas estiveram secas ou amarelas.

O bulbo do alho contém 50 a 60% de água, 2% de materiais minerais, glicosídeos, vitaminas (A, B1, B2, B3 e C) e uma pequena quantidade de azeite essencial (GIMÉNEZ, [s. d.]), sendo seus princípios ativos as vitaminas A, B1, B2 e C; os minerais, enxofre, cálcio, iodo, silício, sódio e ferro; os elementos de traço, germânio e selênio; os compostos sulfurosos, dissulfito de alil, trissulfito de alil, trissulfeto de metil aliila, presentes no óleo volátil e o aminoácido sulfuroso, aliina (sulfóxido de S-alil-L-cistina), presente no bulbo (ÍNDICE TERAPÊUTICO FITOTERÁPICO, 2008).

De acordo com Giménez ([S.d.]) a aliina é convertida em ácido sulfênico pela enzima aliinase a qual é liberada quando o bulbo é triturado. O ácido sulfênico, por sua vez, dimeriza-se formando a alicina, composto muito instável que se decompõe rapidamente produzindo sulfitos voláteis, principalmente dissulfito de dialila, substância bastante estável responsável pelo odor pungente e sabor característico do alho.

De acordo com Índice Terapêutico Fitoterápico (2008), o alho inibe a síntese de colesterol a partir da redução da atividade do grupo tiolato encontrado em muitas enzimas e da oxidação da nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), os quais podem inativar enzimas sulfídricas, coenzima A e HMG-CoA redutase, e oxidar o NADPH. Estes são fatores geralmente necessários para a síntese de lipídeos. A HMG-CoA redutase é uma enzima da via do mevalonato, via metabólica responsável pela produção do colesterol e de outros isoprenoides, e que conseqüentemente contribui para a formação de placas de ateroma. Além disso, em adultos com hipercolesterolemia, a alicina tem a capacidade de reduzir o colesterol total e o colesterol LDL.

A partir do alho foi isolado um componente denominado trissulfito de metil aliila, o qual é encontrado no óleo de alho em uma concentração de 4 a 10% e tem a capacidade de inibir a agregação plaquetária, conferindo à planta atividade antitrombótica. Outras pesquisas indicaram que os compostos antitrombóticos mais potentes presentes no alho são os ajoenos, os quais são úteis em casos de emergência em que se deseja impedir a formação de coágulos (ÍNDICE TERAPÊUTICO FITOTERÁPICO, 2008).

Segundo Índice Terapêutico Fitoterápico (2008) pesquisas em ratos mostraram que os elementos de traço germânico e selênico apresentam a capacidade de melhorar a atividade imunológica, e o dissulfito de dialila, a de proteger os ratos contra tumores de pele quando aplicado topicamente. Ainda, alguns estudos sugerem que o consumo de alho na dieta reduz o risco de câncer de laringe, gástrico, colorretal e endometrial.

Conforme Índice Terapêutico Fitoterápico (2008) o alho também tem atividade antioxidante, conferidas pela alicina, a qual aumenta os níveis de catalase e peroxidase da glutatona, enzimas antioxidantes sanguíneas.

De acordo com o livro citado acima o óleo de alho pode ser utilizado no controle da diarreia uma vez que em estudos com camundongos reduziu o tempo de trânsito gástrico e impediu a diarreia induzida por óleo de rícino por até 3 horas.

De acordo com Pedrazza-Chaverri *et al.*, (1998) *apud* Singi *et al.*, (2006) o alho tem atividade anti-hipertensiva, provavelmente devido à sua capacidade de aumentar a atividade da enzima óxido nítrico sintetase, a qual é responsável pela síntese de óxido nítrico, um potente vasodilatador. Sharifi *et al.*, (2003) *apud* Singi *et al.*, (2006) sugere que o controle da pressão arterial pelo alho se deva à inibição da enzima conversora de angiotensina (ECA). Al-Qattan *et al.*, (2001) *apud* Galante (2008) acreditam que o alho reduza a produção de prostanoídes vasoconstritores e suprima a NHE – 1 (bomba de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup>), a qual é responsável pela reabsorção de sódio do filtrado glomerular.

Segundo Marchiori, [S.d.], o alho tem ação antimicrobiana, inibindo o crescimento de fungos, vírus e várias bactérias Gram positivas e Gram negativas. Ainda de acordo com Deresse, 2010, o alho tem atividade antimicrobiana frente a cepas de *Staphylococcus aureus*. Essa atividade deve-se, provavelmente à alicina, principal fitoquímico biologicamente ativo com atividade antimicrobiana produzido pelo alho (CUTLER; WILSON, 2004).

O alho pode interagir com diversos fármacos, alterando seus perfis farmacocinéticos e/ou farmacodinâmicos, provocando muitas vezes consequências graves aos pacientes, uma vez que pode reduzir a expressão das isoformas CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7, CYP2C9, CYP2C19 e CYP2E1 e da glicoproteína-P (DALVI, 1992; FOSTER *et al.*, 2001; CHEN *et al.*, 2003; PATEL *et al.*, 2004 *apud* ALEXANDRE; BAGATINI; SIMÕES, 2008) ou aumentar a expressão da CYP2C9\*2 (FOSTER *et al.*, 2001 *apud* ALEXANDRE; BAGATINI; SIMÕES, 2008), CYP2B1 (CHEN *et al.*, 2003; LI; TSAI; WU, 2006 *apud* ALEXANDRE; BAGATINI; SIMÕES, 2008), CYP1A1 e CYP3A1 (CHEN *et al.*, 2003 *apud* ALEXANDRE; BAGATINI; SIMÕES, 2008). Reduz a biodisponibilidade de antirretrovirais inibidores de protease e aumenta a biodisponibilidade de relaxantes musculares. Provoca complicações hemorrágicas quando administrado concomitantemente com anticoagulantes orais e antiplaquetários, e potencializa os efeitos terapêuticos e adversos dos hipoglicemiantes. Aumenta o efeito anti-hipertensivo de inibidores da ECA (ALEXANDRE; BAGATINI; SIMÕES, 2008).

## 2.2. Legislação Brasileira sobre fitoterápicos

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), planta medicinal é todo e qualquer vegetal que tem, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou como precursores de fármacos semissintéticos. Já fitoterápico, segundo a Secretaria de Vigilância Sanitária, em sua portaria n° 6 de 31 de janeiro de 1995, é todo medicamento obtido exclusivamente a partir de matérias-primas vegetais. Portanto, fitoterápico diferencia-se de planta medicinal por ser a elaboração de uma da planta para uma formulação específica (VEIGA JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

A RDC 10, de 09 de março de 2010, atualmente em vigor, a qual visa a normatização do registro de medicamentos fitoterápicos junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) reconhece a efetividade do bulbo de alho (*Allium sativum* L.) como hipocolesterolemiantes, expectorantes e antissépticos (BRASIL, 2010).

### **2.3. Investigação do potencial antimicrobiano**

O potencial antimicrobiano de substâncias geralmente é avaliado, estudado e confirmado por meio de ensaios microbiológicos *in vitro*. Estes são realizados por meio de técnicas padronizadas, incluindo os métodos de diluição e/ou difusão em meio sólido. Portanto, a pesquisa de atividade antimicrobiana pode ser analisada com a finalidade de se determinar o espectro antibacteriano ou antifúngico de um novo antimicrobiano ou ainda na verificação da resistência ou sensibilidade de uma bactéria ou fungo a numerosos antimicrobianos.

### **2.4. Mecanismos de ação dos antimicrobianos**

Com base em testes *in vitro*, os agentes antimicrobianos são classificados em bactericidas ou bacteriostáticos. Os agentes bactericidas matam os microrganismos, enquanto os agentes antimicrobianos bacteriostáticos apenas previnem o crescimento bacteriano (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

De um modo geral, os agentes antimicrobianos podem manifestar sua atividade por meio de vários mecanismos: lesão da parede celular, alterações da permeabilidade celular, alterações das moléculas de proteínas e ácidos nucleicos, inibição da síntese de ácidos nucléicos (ROSSI; ANDREAZZI, 2005).

## **3. Material e métodos**

Este estudo foi realizado no laboratório de Microbiologia da Faculdade de Ciências da Saúde (FACISA) do Centro Universitário de Patos de Minas, nos meses de agosto, setembro e outubro de 2010.

### **3.1. Material vegetal**

Foram utilizados os bulbos frescos de *Allium sativum* L. *in natura* e para a preparação de extratos vegetais, provenientes do comércio de Patos de Minas.

O material vegetal adquirido tinha cabeça com túnica de cor branca, bulbos (dentes) com bulbilho (película que cobre os bulbos) branco com listras em tons de amarelo e marrom; bulbos inteiros, de tamanho grande com diâmetro equatorial médio em torno de 0,7mm.

### **3.2. Preparação do material e extratos vegetais**

Os bulbos frescos, depois de selecionados e descascados foram imersos em solução de hipoclorito de sódio (NaOCl) na concentração 0,01% por 30 minutos, a fim de se promover sua desinfecção e garantir a esterilidade do extrato.

### **3.2.1. Decocto**

Três bulbos (3,30g) foram finamente fatiados e colocados para ferver em um béquer juntamente com 200 mL de água destilada durante cinco minutos. Após este processo, foi realizada a filtração, acondicionamento do filtrado em vidro âmbar e armazenamento sob refrigeração entre 2 e 8°C até o uso, que foi realizado no máximo 120 minutos após a filtração.

### **3.2.2. Infuso**

Três bulbos (3,30g) foram finamente fatiados e colocados em um béquer juntamente com 200 mL de água destilada fervente. O béquer foi tampado com um vidro de relógio por cinco minutos. Após este processo, foi realizada a filtração, acondicionamento do filtrado em vidro âmbar e armazenamento sob refrigeração entre 2 e 8°C até o uso, que foi realizado no máximo 120 minutos após a filtração.

### **3.2.3. Macerado**

Bulbos foram finamente fatiados e deixados em maceração em água destilada à temperatura ambiente por 60 minutos (0,5g de bulbo para cada 30 mL de água). Após este processo, foi realizada a filtração, acondicionamento do filtrado em vidro âmbar e armazenamento sob refrigeração entre 2° e 8°C até o uso, que foi realizado no máximo 120 minutos após a filtração. Neste caso, os princípios ativos não são alterados pela fervura ou temperaturas altas.

### **3.2.4. Extrato hidroalcoólico**

Dez gramas de bulbo foram submetidas à trituração, com solução hidroalcoólica a 70° GL em álcool (v/v), em liquidificador por 2 minutos. Após filtragem o material foi rotaevaporado, acondicionado em vidro transparente e armazenamento sob refrigeração entre 2° e 8°C.

O extrato obtido ainda foi diluído, a fim de se obter três concentrações diferentes (0,05, 0,025 e 0,012).

## **3.3. Análise farmacognóstica**

As análises farmacognósticas foram realizadas a fim de se detectar a presença de compostos de interesse, e os testes realizados para a identificação de alcaloides, antraquinonas, flavonoides, saponinas e taninos, seguindo-se as metodologias validadas para cada grupo.

Para a pesquisa de alcaloides foram realizados os testes com os reativos de Dragendorff e Mayer. As antraquinonas foram pesquisadas a partir da realização do teste de Bornträger. Os testes para flavonoides consistiram das reações de Shinoda (da cianidina), com cloreto férrico, com cloreto de alumínio e com hidróxidos alcalinos. A



presença de saponinas foi verificada por meio do teste de espuma persistente. Para a presença de taninos foram realizadas as reações com gelatina, com sais de ferro, com acetato de chumbo e com vanilina (Mello *et al.*, 1997; Falkenberg *et al.*, 2003).

### **3.4. Avaliação da atividade antibacteriana**

#### **3.4.1. Microrganismos utilizados**

As cepas selecionadas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 14948), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) foram obtidas do Laboratório Universitário de Análises Clínicas (LUAC) do Centro Universitário de Patos de Minas. A escolha das cepas foi baseada nas análises de dados epidemiológicos de pacientes em que a frequência era alta para estes agentes infecciosos. Antes de serem utilizadas no estudo, todas as cepas foram armazenadas no LUAC em caldo TSB (caldo tríptico de soja).

#### **3.4.2. Método de difusão em ágar – técnica do poço**

O teste para determinação da atividade antimicrobiana foi realizado pelo método de difusão em poço, em triplicata.

Procedeu-se à triagem da atividade antimicrobiana dos extratos de acordo com a recomendação da National Commitee for Clinical Laboratory Standard (NCCLS, 2000).

Em câmara de fluxo laminar VECO, modelo VLF512, previamente esterilizada por radiação ultravioleta a suspensão bacteriana foi inoculada por espalhamento sobre o ágar Müeller-Hinton. Em seguida, confeccionaram-se poços/orifícios de 5,0 mm de diâmetro em pontos equidistantes; foram dispensados 40,0µL dos extratos de *Allium sativum* L. e do óleo de alho nos poços devidamente identificados.

As placas foram incubadas a 37°C por 18 a 24 horas. Decorrido o período de incubação, mensuraram-se as zonas de inibição com o auxílio de régua milimetrada, no que diz respeito ao halo (diâmetro da área com ausência de desenvolvimento microbiano).

##### **3.4.2.1. Preparo dos meios de cultura**

###### **3.4.2.1.1. Caldo Tioglicolato**

O caldo Tioglicolato foi escolhido para o experimento por ser altamente nutritivo e versátil. Este meio é composto por: 17,0g/L de caseína enzimática hidrolisada, 3,0g/L de digestão papáica de farinha de soja, 6,0g/L de dextrose, 2,5g/L de cloreto de sódio, 0,5g/L de glicolato sódico, 0,25g/L de L-cistina, 0,1g/L de sulfito de sódio e 0,7g/L de ágar.

O meio de cultura foi preparado a partir de uma base desidratada disponível comercialmente (Diagnostic Thioglycollate Medium – Himedia, Lote XK046, Cód. M191). Foram dissolvidos 30 gramas da base desidratada em 1000 mL de água destilada. Em seguida, a mistura foi aquecida até completa dissolução do meio. O meio dissolvido foi

acondicionado em um recipiente de vidro autoclavável e esterilizado em autoclave a uma pressão de 1 atm e 121°C de temperatura por 15 minutos. Após a esterilização o meio foi resfriado a temperatura ambiente e armazenado em geladeira (de 2º a 8°C) antes do uso. O pH do meio após o preparo (a 25°C) era igual a 7,0.

#### **3.4.2.1.2. Ágar Müller-Hinton**

O ágar Müller-Hinton foi escolhido para o experimento devido à sua reprodutibilidade aceitável entre os diferentes lotes, e por permitir crescimento satisfatório dos patógenos. É composto por 2,0g de extrato de carne em pó, 17,5g de digestão ácida de caseína, 1,5g de amido e 17,0g de ágar (fórmula aproximada por litro).

O meio de cultura foi preparado a partir de uma base desidratada disponível comercialmente (Mueller-Hinton Agar Difco™, Lote 9188947, Ref. 225250). Foram dissolvidos 38g da base desidratada em 1 litro de água destilada. Em seguida, homogeneizou-se a mistura e aqueceu-a com agitação constante durante 1 minuto para a completa dissolução do pó. Procedeu-se então sua esterilização em autoclave a uma pressão de 1 atm e 121°C por 15 minutos. Imediatamente após passar pela autoclave, foi resfriado em banho-maria entre 45 e 50°C. Em seguida, o meio recém-preparado foi despejado em placas de petri de fundo chato e, novamente resfriado, agora, à temperatura ambiente, para garantir uma profundidade uniforme de aproximadamente 4 mm (corresponde a 25-30 mL em placas com diâmetro de 100 mm). Logo após foi armazenado na geladeira (de 2 a 8°C).

#### **3.4.2.2. Preparo do inóculo bacteriano**

Em câmara de fluxo laminar VECO, modelo VLF512, previamente esterilizada por radiação ultravioleta, selecionou-se da placa de ágar que continha a cepa ATCC 3 a 5 colônias, bem isoladas e do mesmo tipo morfológico, as quais foram tocadas com uma alça descartável estéril, e em seguida transferidas para um tubo de ensaio de vidro contendo 2,5mL de caldo tioglicolato.

Logo, a cultura foi incubada, a 35° C, até alcançar a turbidez de uma solução padrão de McFarland 0,5. Isso resultou numa suspensão contendo aproximadamente de 1 a 2 x 10<sup>8</sup> UFC/mL. Para realização dessa operação a olho nu, comparou-se o tubo de inóculo com a solução padrão McFarland de 0,5.

#### **3.4.2.3. Controles utilizados**

Foram utilizados como controles positivos discos de difusão de antimicrobianos, respeitando o perfil de sensibilidade de cada grupo e/ou a individualidade dos microrganismos; e como controle negativo, o solvente utilizado na preparação dos extratos para validar todas as etapas das técnicas, da seguinte forma:

Controle negativo: poço inoculado com água destilada;

Controle positivo: discos de difusão de antimicrobianos específicos para cada grupo de microrganismo, Oxacilina (1mcg – Cefar®) para bactérias Gram-positivas e Cefepima (30mcg – Cefar®) para bactérias Gram-negativas.

#### 4. Resultados e discussão

Os extratos obtidos, pelos diferentes processos de preparação, tiveram coloração branco-amarelado, odor forte e pungente e sabor ardido, característicos do alho.

Quando cortado, o alho tem um cheiro pungente e um sabor forte devido à presença de aliina (um sulfóxido que é um constituinte natural do alho fresco), que se decompõe numa grande quantidade de compostos de enxofre (ABIB JUNIOR, 2004).

Os resultados obtidos a partir da análise farmacognóstica, realizada a fim de se detectar compostos de interesse no extrato de alho estão indicados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Resultados dos testes para identificação dos metabólitos secundários presentes do extrato de *Allium sativum* L.

Metabólito	Reação	Resultado	Descrição
Flavonoides	com hidróxidos alcalinos	-	Não houve alteração
	com cloreto de alumínio	-	Não houve alteração
	com cloreto férrico de Shinoda	+	Coloração laranja claro
	(da cianidina)	+	Coloração verde claro
Taninos	com gelatina	-	Não houve alteração
	com sais de ferro	-	Não houve alteração
	com acetato de chumbo	-	Não houve alteração
	com vanilina	+	Precipitado esbranquiçado
Alcaloides	Mayer	+	Coloração esbranquiçada
	Dragendorff	+	Coloração vermelho-tijolo
Saponinas	Espuma persistente	-	< 1cm por 15 minutos
Cumarinas	Fluorescência azul	+	Fluorescência azul
Antraquinonas	Teste de Bornträger	-	Ausência de coloração rósea

Fonte: Resultados obtidos durante o experimento.

Os flavonoides podem ser classificados em flavonas, flavanonas, flavonóis, diidroflavonóis, isoflavonas, chalconas ou antocianidinas, dependendo da sua estrutura química. A identificação dessas classes é baseada em reações coloridas em face do número e posição das hidroxilas fenólicas presentes nos anéis A e B do núcleo fundamental, utilizando-se quase sempre a propriedade química dos compostos flavonóidicos de formação de sais que em meio básico promovem a intensificação ou mesmo a modificação da cor de suas soluções (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2001). Para a identificação de flavonoides no extrato de alho foram realizados quatro testes, que consistiram das reações de Shinoda (da cianidina), com cloreto férrico, com cloreto de alumínio e com hidróxidos alcalinos, as quais indicaram a presença de flavonas no mesmo, uma vez que apenas as reações de Shinoda e com cloreto férrico apresentaram-se positivas, o

que pode ser visualizado pela presença de coloração verde claro e coloração laranja claro, respectivamente.

A natureza química complexa dos taninos dificulta sua identificação, razão pela qual se usa para esse fim um conjunto de reações, sendo que o resultado de nenhuma delas, isoladamente, serve para caracterizar o grupo. A variação do aspecto e coloração dos precipitados formados durante as mesmas vai depender da natureza e complexidade dos compostos tânicos presentes na solução. De maneira geral, os taninos são divididos em dois grandes grupos: os hidrolisáveis e os condensados (MONTEIRO *et al.*, 2005). A identificação de taninos no extrato de alho foi realizada a partir da execução das reações com gelatina, com sais de ferro, com acetato de chumbo e com vanilina. Apenas a reação com vanilina apresentou-se positiva, pelo surgimento de precipitado esbranquiçado, evidenciado assim, a presença de taninos hidrolisáveis, uma vez que não foram encontrados relatos anteriores da presença de taninos no alho.

Os alcaloides apresentam em sua molécula um ou mais átomos de nitrogênio com a disponibilidade de um ou mais pares de elétrons, o que confere a este metabólito um caráter básico que possibilita a formação de sais em meio ácido. Na identificação, a distinta hidrossolubilidade dos sais de alcaloides e a solubilidade dos mesmos em solventes orgânicos na sua forma livre são a propriedade mais utilizada (RISTON, 2006). A presença de alcaloides no extrato de alho pode ser verificada através da realização dos testes com os reativos de Dragendorff e Valser-Mayer, nos quais se pode observar o surgimento de coloração esbranquiçada e coloração vermelho-tijolo, respectivamente.

Saponinas são glicosídeos de esteroides ou de terpenos policíclicos, que têm uma parte com característica lipofílica, os triterpenos ou esteroides, e outra parte com característica hidrofílica, os açúcares. Em meio aquoso as saponinas formam grande quantidade de espuma; portanto, drogas que a contenham, quando agitadas com vigor, promovem a formação de espuma abundante e persistente (LIMA, 2009). Tal teste foi realizado a fim de se pesquisar a presença de saponinas no extrato de alho; todavia, apresentou-se negativo para presença de saponinas.

As cumarinas são heterosídeos que, puros, não são fluorescentes, mas em meio alcalino, há a formação do ácido cis-o-hidroxicinâmico que se converte no isômero trans, fluorescente, sob a ação da radiação ultravioleta. Ao se realizar tal teste para o extrato de alho, pode-se observar fluorescência azul, evidenciando presença de cumarinas (MIRANDA, 2001). Esse resultado evidencia a possibilidade de as cumarinas podem agir sinergicamente a outros componentes do alho na atividade antitrombótica do alho. Estudos indicaram que o ajoeno, composto formado pela reação de condensação de duas moléculas de alicina, tem efeito antitrombótico, parecendo inibir a agregação das plaquetas, independentemente do mecanismo de indução (Índice Terapêutico Fito-terápico, 2008).

As antraquinonas são quimicamente definidas como substâncias fenólicas derivadas da dicetona do antraceno. Podem estar presentes nos fármacos na forma livre ou na forma de glicosídeo, isto é, na qual uma molécula de açúcar está ligada nas formas de O- e C-glicosídeo, em várias posições. O teste de Bornträger é frequentemente usado para detecção de antraquinonas livres, em que coloração rósea, vermelha ou violeta é desenvolvida em meio básico (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 2001). Para a identificação

de antraquinonas no extrato de alho utilizou-se o teste de Bornträger, no qual não houve aparecimento de coloração rósea, indicando reação negativa e ausência deste metabólito no extrato analisado.

Em estudos de atividade antimicrobiana de extratos brutos de espécies vegetais, o potencial antimicrobiano, muitas vezes, não se deve a uma única substância, mas sim, a um conjunto dessas. Um extrato bruto de uma espécie vegetal que tem efeito bactericida satisfatório poderia não necessitar, portanto, de processos de isolamento de substâncias ativas, reduzindo, assim, etapas químicas e, conseqüentemente, custos financeiros. Isso viabiliza uma possível utilização como fitoterápico (CUNHA, 2006). Por outro lado, geralmente os compostos presentes em menor proporção na planta são os que apresentam melhores efeitos biológicos.

Os resultados obtidos a partir do teste para determinação da atividade antimicrobiana estão indicados na Tabela 2. Diante dos resultados obtidos pelo método de difusão em poço, a espécie vegetal (*Allium sativum* L.) avaliada apresentou potencial antimicrobiano para os microrganismos testados *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*.

**Tabela 2.** Resultado do teste para determinação da atividade antimicrobiana realizado pelo método de difusão em poço

Microrganismo	CP	CN	Alho <i>in</i> <i>natura</i>	Cápsula de óleo de alho	Extratos			
					Decocto	Infuso	Macerado	Hidroalcoólico
<i>S. aureus</i>	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>E. coli</i>	+	-	+	-	-	-	-	+
<i>P. aeruginosa</i>	+	-	+	-	-	-	-	+

Teste realizado em triplicata em que (+) indica presença de halo de inibição e (-) a ausência de halo de inibição. CP = Controle positivo e CN = Controle negativo.

Fonte: Resultados obtidos durante o experimento.

Verifica-se que o alho *in natura* e o extrato hidroalcoólico apresentaram atividade antimicrobiana ante todos os microrganismos testados, em contraste com a cápsula de óleo de alho e com os extratos aquosos, que não exerceram atividade antimicrobiana contra esses microrganismos. Esses resultados encontram-se de acordo com os registrados por Deresse (2010), no qual o alho fresco apresentou melhor atividade antibacteriana, uma vez que tal propriedade do extrato de alho é sensível ao calor. De acordo com Cutler e Wilson (2004), a alicina, agente antibacteriano mais potente do extrato de alho, é bastante instável, perde suas propriedades rapidamente, quebrando-se em 16 horas a 23°C.

Todavia, a ausência de atividade antimicrobiana para os extratos aquosos diverge de outros trabalhos da literatura, em que uma mistura de alho triturado em água utilizada no tratamento de ferimentos da pele infectados apresentou atividade antimicrobiana (MATOS, 2002).

Ainda segundo Lawson *et al.* (1992) *apud* Abib Junior (2004), os constituintes do alho variam muito de acordo com a preparação realizada, tanto qualitativamente quan-

to quantitativamente. Sendo assim, pode-se justificar a diferença da atividade antimicrobiana de algumas preparações em relação a outras.

Quanto às diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico, verificou-se que todos apresentaram atividade antimicrobiana sobre os microrganismos testados. Conforme apresentado na tabela 3, a atividade foi diretamente proporcional à concentração do extrato. Pode ser observado que quanto maior o tamanho do halo de inibição medido em milímetros, melhor é o efeito *in vitro* do antimicrobiano.

**Tabela 3.** Atividade inibitória medida pelo tamanho do halo de diferentes concentrações do extrato hidroalcoólico de *Allium sativum* L. sobre *S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa* determinada pelo método de difusão em poço.

Microrganismo	CP	CN	Extrato Hidroalcoólico		
			Halo de inibição (mm) conc. 0,05	Halo de inibição (mm) conc. 0,025	Halo de inibição (mm) conc. 0,012
<i>S. aureus</i>	20±1	0	21±1	15±1	12±1
<i>E. coli</i>	22±1	0	20±1	14±1	12±1
<i>P. aeruginosa</i>	21±1	0	22±1	15±1	7±1

Fonte: Resultados obtidos durante o experimento.

O potencial antimicrobiano apresentado pelo extrato do *Allium sativum* L pode estar relacionado à presença de taninos no mesmo, os quais são uma ótima substância antimicrobiana devido à sua capacidade de precipitar proteínas. À medida que ocorreu a diminuição da concentração do extrato, diminuiu também a concentração de taninos e, conseqüentemente, o poder antimicrobiano deste.

Todavia, o extrato de alho tem, além de taninos, alcalóides, cumarinas e flavonoides, os quais podem também estar relacionados à atividade antimicrobiana apresentada pelo mesmo. Segundo Cutler e Wilson (2004), a alicina constitui o principal fitoquímico biologicamente ativo com atividade antimicrobiana produzido pelo alho.

## 5. Conclusões

Verifica-se que apenas o alho *in natura* e o extrato hidroalcoólico apresentaram atividade antimicrobiana frente aos microrganismos testados (*S. aureus*, *E. coli* e *P. aeruginosa*). Entretanto, as preparações, usualmente utilizadas pela população no tratamento de infecções, cápsula de óleo de alho e extratos aquosos, mostraram-se ineficazes para este fim, no presente estudo.

A partir da análise farmacognóstica, observou-se a presença de flavonoides (flavonas), taninos (hidrolisáveis), alcaloides e cumarinas no extrato hidroalcoólico de *Allium sativum* L., os quais podem estar contribuindo com a atividade antimicrobiana apresentada pelo extrato do alho, uma vez que o potencial antimicrobiano de extratos

vegetais, muitas vezes, não se deve a uma única substância, mas sim, a um conjunto dessas.

## 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*. 91 f. Tese (Doutorado em clínica médica) – Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

ALEXANDRE, R. F.; BAGATINI, F.; SIMÕES, C. M. O. Potenciais interações entre fármacos e produtos à base de valeriana ou alho. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. [S.l.], v. 18, n. 3, p. 455-463, jul./set. 2008.

ALMASSY JUNIOR, A. A. *et al.* *Folhas de chá: plantas medicinais na terapêutica humana*. Viçosa: UFV, 2005. 233 p.

BRASIL 2010. Ministério da saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Instrução Normativa nº 10 de 09 de março de 2010. *Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e dá outras providências*. DOU. Poder Executivo, Brasília, DF, 9 mar. 2010.

CUNHA, L. S. *Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos brutos de plantas do cerrado, substâncias isoladas e derivados semi sintéticos frente a microrganismos bucais*. 2006. 170 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Universidade de Franca, Franca, 2006.

CUTLER, R.R.; WILSON, P. Antibacterial activity of a new, stable, aqueous extract of allicin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *British Journal of Biomedical Science*. Londres, v. 61, n. 2, p. 1-4, mar. 2004;

DERESSE, D. Antibacterial effect of garlic (*Allium sativum*) on *Staphylococcus aureus*: An *in vitro* study. *Assian Journal of Medical Sciences*. Awassa Ethiopia, v. 2, n. 2, p. 62-65, mar. 2010.

FALKENBERG, M. B.; SANTOS, R. I.; SIMÕES, C. M. O. Introdução à análise fitoquímica, in: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; Petrovick, P. R. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. 3. ed. Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 2001. p. 229-245.

FOGLIO, M. A. *et al.* Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. *Revista Multiciência*. Construindo a história dos produtos naturais. Campinas, n. 7, out. 2006. Disponível em: <[http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos\\_07/a\\_04\\_7.pdf](http://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_04_7.pdf)>. Acesso em 31 maio 2010.

FREI, H.; WURGLER, F. E. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) in *Drosophila*. *Mutation Research*. [S.l.], v. 334, n. 2, p. 247-258, abr. 1995.

GALANTE, R. M. *Extração de Inulina do alho (Allium sativum L. var. Chonan) e simulação dos processos em batelada e em leito fixo*. 2008. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

GAZOLA, R.; SINGI, G.; RESENDE, R. Efeitos do extrato hidroalcoólico de *Allium sativum* (alho) sobre a pressão arterial média em ratos anestesiados. *Revista Lecta*. Bragança Paulista, v. 20, n. 2, p. 167-169, dez. 2002.

GIMÉNEZ, M. D. G. Ajo, in: DÍAZ, Luiz Bravo. *Farmacognosia*. Madrid: Elsevier, [S.d.]. p. 25-26.

ÍNDICE TERAPÊUTICO FITOTERÁPICO: ITF. Rio de Janeiro: EPUB, 2008. 328 p.

JOLY, A. B. *Botânica: introdução à toxonomia vegetal*. 12 ed. São Paulo: Nacional, 1998. 777 p., v. 4.

LIMA, F. G. *Ações biológicas das saponinas esteroidais em ruminantes: Revisão da literatura*. 2009. 22 f. Dissertação (Pós-graduação em Ciência Animal) – Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. Abreu. *Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas*. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 312-313.

MATOS, F.J.A. *Farmácias Vivas: Sistema de Utilização de Plantas Medicinais* Projetado para Pequenas Comunidades. 4 ed. Fortaleza: Editora UFC, 2002. 267p.

MARCHIORI, V. F. Propriedades funcionais do alho (*Allium sativum* L.). Disponível em: <[http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/alho\\_revisado.pdf](http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/alho_revisado.pdf)>. Acesso em: 07 nov. 2010.

MELLO, J.C.P.; CORTEZ, D.A.G.; CARDOSO, M.L.C. *Análise fitoquímica preliminar*. Maringá: Universidade Federal de Maringá, 1997, pp. 12-19.

MIRANDA, J. A. *Caracterização fotofísica de derivados de cumarinas*. 2001. 160 f. Dissertação (Pós-graduação em Química) – Universidade de Uberlândia, Uberlândia, 2001.

MONTEIRO, J. M. Taninos: uma abordagem química à ecologia. *Química Nova*. Recife, v. 28, n. 5, p. 892-896, abr. 2005.

NATIONAL COMMITTEE OF CLINICAL LABORATORY STANDARDS (NCCLS). *Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests*. WAYNE, 2000.

RISTON, J. R. *Estudos visando a síntese de estereosseletina do alcalóide 275A*. 2006. 216 f. Dis-



sertação (Mestrado em Química Orgânica) – Universidade de Campinas, Campinas, 2006.

ROSSI, F.; ANDREAZZI, D. B. *Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma*. São Paulo: Atheneu, 2005. 118 p.

SINGI, Glenan *et al.* Efeitos Agudos das Frações Hexânicas de Alho (*Allium sativum* L.), de Capim-Limão [*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf] e de suas Associações sobre a Pressão Arterial de Ratos Anestesiados. *Acta Farm. Bonaerense*. Alfnas, v. 25, n.1, p. 108-111, jan. 2006.

SOUSA, R. J. *et al.* *Cultura do alho*. Lavras: UFLA, 2002. 90 p, v. 14.

VEIGA JUNIOR, Valdir F.; PINTO, Angelo C.; MACIEL, Maria Aparecida M. Plantas medicinais: cura segura?. *Química Nova*. São Paulo, v. 28, n. 3, maio/jun. 2005.