UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

UNICAMP

CONCORDÂNCIA DO ORIENTADOR

Declaro que o (a) aluno (a) Karina dos Santos Domingues RA 085910 esteve sob minha orientação para a realização do Trabalho de Conclusão de Curso intitulado "Efeito do extrato de *Allium sativum* sobre a atividade antimicrobiana da amoxicilina contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina" no ano de 2012.

Concordo com a submissão do trabalho apresentado à Comissão de Graduação pelo aluno, como requisito para aprovação na disciplina DS833 - Trabalho de Conclusão de Curso.

Piracicaba, 02 de Outubro de 2012

Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

" Efeito do extrato de *Allium sativum* sobre a atividade antimicrobiana da amoxicilina contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina "

Karina dos Santos Domingues

Piracicaba

2012

Karina dos Santos Domingues

" Efeito do extrato de *Allium sativum* sobre a atividade antimicrobiana da amoxicilina contra cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à penicilina "

Monografia apresentada ao curso de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP, para obtenção do diploma de cirurgiã dentista.

Orientadora: Dra. Michelle Franz Montan Braga Leite

Piracicaba

2012

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
JOSIDELMA F COSTA DE SOUZA – CRB8/5894 - BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA DA UNICAMP

Domingues, Karina dos Santos, 1987-
D713e Efeito do extrato de Allium sativum sobre a atividade antimicrobiana da amoxicilina contra cepas de Staphylococcus aureus resistentes à penicilina / Karina dos Santos Domingues. -- Piracicaba, SP: [s.n.], 2012.

Orientador: Michelle Franz Montan Braga Leite.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Fitoterapia. 2. Alho. 3. Infecções Bacterianas. 4. Bacterias aeróbias. I. Franz-Montan, Michelle. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Donisete e Geni, e ao meu irmão Danilo, pelo amor e apoio incondicionais.

Agradecimentos

Não sei quantas vezes tornarei a concluir uma graduação nessa vida, peço então, permissão para ser loquaz em meus agradecimentos.

Em primeiro momento, quero agradecer a Deus, que mesmo nos momentos em que duvidei de sua força, operou obras maravilhosas em minha vida e renovou a minha fé através do Amor.

Gostaria também de agradecer ao meu pai, Donisete, por acreditar no meu sonho, e não ter medido esforços para custeá-lo. Por ser minha referência de honestidade e perseverança, e por cada gota de suor derramada sem descanso e que se converteram em recursos e tonara possível a edificação do meu objetivo.

Agradeço também a minha mãe, Geni, por toda a dedicação e amor em todos esses anos, por acreditar em mim quando eu mesma já não acreditava. Por chorar minhas lágrimas e vibrar minhas vitórias, e trazer paz nos momentos de caos. Por ser meu exemplo de mulher forte, batalhadora, mãe carinhosa e pessoa de Deus. E por cada oração dedicada a mim, pois tenho certeza que elas foram fundamentais para afastar qualquer mal que pudesse me distanciar do meu sonho.

Quero agradecer também ao meu irmão, Danilo, por ser o melhor irmão caçula que alguém poderia ter. Por dividir comigo expectativas e sonhos e por ser parte inerente do meu coração.

Agradeço também ao meu noivo, Djan, pelo companheirismo, amor, carinho e paciência a mim dedicados durante essa trajetória. Por ter sido meu ombro amigo nos momentos de angustia, meu cuidador nos momentos de exaustão e pessoa compreensiva nos momentos em que me fiz ausente.

Agradeço a todos que estiveram presentes em minha vida nesses anos de graduação, em especial a: Priscila Lima, Carolina Carli, Milene Mazuchi, Renato Bello, Jéssica Pignati, Luisa Balero, Renata Melo, Larissa Rodrigues, Gustavo Corradini, Laila Brasil, Ana Carolina Pescialo, Cynthia Lopes, Angelina Serafini, Cynthia Rangui, Igor Ferrante, Marina Aleixo, Erick Coppini, Isabela Tardivo, Teresa Barbosa, Veronica Canuto, Thais Takao, Mariana Vercelino, Larissa Pacheco, Tamires Papetti, Nicolas Carrieri e tantos outros pela convivência, lembranças,

lágrimas, risadas e momentos especiais que passamos juntos. E em especial, agradeço a Juliana Amato, por todo o apoio e carinho, principalmente no meu último ano de graduação; a Priscila Anjos por ser amiga de todas as horas; a Karina Giovanetti, pelo amparo nos momentos em que mais precisei; e ao meu amigo Antônio Junior, pessoa fundamental em minha vida, por me ouvir, me amar, me apoiar e aliviar minha alma nos momentos de dor.

Agradeço também as minhas companheiras e amigas de “sextante”, Lilian Lopes, Karen Watanave, Karina Mazzetto, Ligia Spada e Larissa Rezende, por todo esse tempo de convivência em harmonia, tornando minha vivência na clínica de graduação infinitamente mais leve e feliz.

Agradeço a todos os professores e pós-graduandos, que com admirável dedicação, ensinaram-me a arte e ciência da Odontologia. Em especial aos professores: Sérgio Line, Daniel Saito, Fausto Berzin, Jaime Cury, Eduardo Andrade, Maria Cristina Volpato, Mario Sinhoretti, Márcio Lopes, Ricardo Coletta, Edgar Graner, Wilkens Buarque , Frab Boscolo, Luciana Asprino, João Sarmento, Eduardo Daruge Junior e em especial ao Professor Marcelo Giannini.

E aos pós-graduandos: Juliana Públio, Ana Paula Ayres, Carolina Bosso, Viviene Barbosa, Thaís Gonçalves, Tiago Taiete, Ana Pimentel, Mariana Agustinho.

Registro também meus sinceros agradecimentos a todos os funcionários da FOP-UNICAMP, em especial a Daiane Cassiatore, Janaina Leite, Cristiane Tristão, Edson Feliciano, Mauro Dias, Reinaldo Casagrande, Luiz, Sirlei, Elisangela, Edna Cosmo, Paulo Alcarde e Marcos Rapetti, pela paciência, ajuda e compreensão.

Agradeço também ao professor Francisco Carlos Groppo, que além de professor exemplar, também me proporcionou vivência na área cientifica e acadêmica da profissão.

Agradeço ao pós-graduando Luiz Eduardo Ferreira, por todo o tempo e ajuda a mim dedicados durante a execução desse projeto.

E a Minha Orientadora neste trabalho de conclusão de curso, Michelle Franz Montan Braga Leite, que me foi solicita desde o primeiro instante, dando-me ferramentas para concluir com qualidade essa obra.

“Quando o mistério é impressionante demais, a gente não ousa desobedecer”
Antoine de Saint- Exupéry.

RESUMO

O tratamento de infecções associadas às bactérias resistentes é atual e preocupante. Novos antibióticos e novas terapias, além de apresentarem um alto custo, demandam um tempo considerável para estarem disponíveis para terapêutica medicamentosa. A estratégia contemporânea tem sido a tentativa da melhora nas propriedades e características dos fármacos que já existem. Vários fitoterápicos têm mostrado potencial antimicrobiano, mas seu uso ainda é restrito. A proposição deste estudo foi avaliar o efeito do alho (*Allium sativum*) sobre a ação antibacteriana da amoxicilina em cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes em ratos. Esta é uma abordagem relativamente nova sobre a utilização de fitoterápicos no tratamento de doenças infecciosas. Um extrato de alho foi utilizado em conjunto com a amoxicilina no tratamento de infecção estafilocócica, induzida por *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente (MRSA) ATCC 33591, em ratos. Quatro espojas de PVC foram implantadas separadamente no dorso de 30 animais. Após 14 dias, os granulomas formados foram infectados com MRSA. Após 24h da infecção, os animais foram divididos aleatoriamente em cinco grupos de 6 animais, os quais foram sacrificados após a administração dos fármacos nos tempos 0h (somente para o grupo controle) e após 24 horas. A divisão dos grupos quanto à administração dos fármacos foi: 1) Grupo Controle – soro fisiológico 1mL/kg a cada 8 horas, subdivididos em dois grupos que foram sacrificados logo após a primeira administração e após 24 horas; 2) Grupo amoxicilina – 50 mg/kg da suspensão de amoxicilina a cada 8 horas; 3) Grupo alho – 100 mg/kg do extrato de A. sativum a cada 8 horas; 4) Grupo amoxicilina/alho – amoxicilina 50 mg/kg e alho 100 mg/kg a cada 8 horas. A administração do fitoterápico foi realizada 15 min após a administração da amoxicilina. Após os tratamentos, os granulomas retirados foram acondicionados em tubos de ensaio, sofreram dispersão em ultrassom e a suspensão resultante foi cultivada em meio de cultura (ágar sal e manitol). Após 18 horas as colônias foram contadas manualmente. Os resultados foram comparados através do teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%. Apesar do extrato do alho sozinho ou em associação com a amoxicilina terem reduzido significativamente o número de bactérias em relação ao grupo controle ($p<0.05$), esses tratamentos não apresentaram diferença em relação ao grupo amoxicilina ($p>0.05$). Conclui-se que os tratamentos com alho podem não ser suficientemente

efetivos uma vez que não apresentaram diferença estatística em relação ao tratamento com amoxicilina isolada.

Palavras chave: Fitoterapia; Alho; Infecções Bacterianas; Bactérias Aeróbias.

ABSTRACT

Treatment of infections caused by resistant bacteria is of topical interest and worrying. New antibiotics and new therapies are expensive and require considerable time to be available as a drug therapy. The contemporary strategy is the improvement of the properties and characteristics of drugs that already exist. Several herbal medicines have shown antimicrobial potential, but its use is still limited. The objective of the present study was to evaluate the effect of garlic (*Allium sativum*) on the antibacterial activity of amoxicillin against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in rats. The use of herbal medicines in the treatment of infectious diseases is a relatively new approach on antibiotic therapy. The garlic extract was used with amoxicillin for the treatment of staphylococcal infection induced by methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ATCC 33591, in mice. Four PVC-sponges were individually implanted in the dorsum of 30 animals. After 14 days, the developed granulomas were infected with MRSA. After 24h of infection, the animals were randomly divided into five groups of six animals which were sacrificed after drug administration at the times 0h (only for control) and after 24 hours. The division of the groups regarding the administration of the drugs was: 1) Control Group – 1 mL/kg saline every 8 hours, divided into two groups that were sacrificed right after the first dose and after 24 hours, 2) Group amoxicillin – 50 mg/kg of the suspension of amoxicillin every 8 hours, 3) Group garlic – 100 mg/kg of the extract of A. sativum every 8 hours, 4) Group amoxicillin / garlic - amoxicillin 50 mg/kg and garlic 100 mg/kg every 8 hours. The administration of the garlic extract was performed 15 min after administration of amoxicillin. After treatments, the granulomas removed were placed into test tubes, and were submitted to ultrasound dispersion and the resulting suspension was grown in culture medium (agar and mannitol salt). After 18 hours counts were carried out manually. The results were compared by Kruskal-Wallis test, with significance level of 5%. Despite the garlic extract alone or in combination with amoxicillin significantly reduced the number of bacteria in comparison to the control group ($p < 0.05$), these treatments were not different from the amoxicillin group ($p > 0.05$). In conclusion, the treatment with garlic may not be sufficiently effective since it was not observed no statistical difference compared with the treatment with amoxicillin alone.

Key words: Phytotherapy; Garlic; Bacterial Infections; Bacteria, Aerobic.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 1

2. REVISÃO DE LITERATURA 3

2.1 Antibióticos 3

2.2 Farmacologia dos Antibióticos 3

2.3 .Mecanismo de ação dos antibióticos 4

2.4 Antibióticos na Odontologia 5

2.5 Penicilinas 7

2.6 Resistência Bacteriana 8

JUSTIFICATIVA 12

3. PROPOSIÇÃO 13

4. MATERIAL E MÉTODOS 13

4.1 Materiais 13

4.2 Animais 14

4.3 Preparo do extrato de *Allium sativum* 14

4.4 Cultura do microrganismo *Staphylococcus Aureus* para infecção do granuloma 15

4.5 Indução de granuloma, infecção do tecido granulomatoso e tratamentos realizados 15

Analise estatística. 17

5. RESULTADOS 18

6. DISCUSSÃO 20

7. CONCLUSÃO 22

REFERÊNCIAS 23

Anexo 1 30

Anexo 2 31

1. INTRODUÇÃO

O uso excessivo de antimicrobianos para infecções menores e doenças não bacterianas vem submetendo os seres humanos à toxicidade destes fármacos e a possibilidade de "super infecções". Cada vez mais o fenômeno da resistência múltipla (capacidade de um microrganismo sobreviver a altas concentrações de várias classes de antimicrobianos diferentes) vem se mostrando presente em diversos tipos de infecção tais como: meningites, infecções estafilocócicas, estreptocócicas, causadas por *Klebsiella pneumoniae*, *Serratia marcescens*, *Enterobacter cloacae*, *Pseudomonas aeroginosa* entre outras (JONES et al., 2004). Este fato torna necessária a procura incessante por novos agentes ou novos métodos de combate às infecções.

Dentre as bactérias do grupo dos estafilococos, o *Staphylococcus aureus* é o mais importante agente causador de patologias infecciosas em seres humanos. Entretanto, este microrganismo faz parte da microbiota natural humana, podendo causar infecções oportunistas significantes sob condições apropriadas (WALDVOGEL, 1990). Frequentemente, o *S. Aureus* é isolado de infecções em feridas pós-cirúrgicas, as quais podem servir como nicho, possibilitando o desenvolvimento de infecções sistêmicas (KONEMAN et al., 1994).

Essas bactérias adquiriram importância ainda maior a partir da observação de que a incidência de endocardite estafilocócica tem aumentado drasticamente. Cepas de S. aureus sensíveis aos beta-lactâmicos são os agentes etiológicos responsáveis pela endocardite em mais de 70% dos casos da doença diagnosticada em pacientes que fazem uso de drogas por via endovenosa. Outra razão é o fato de que os estafilococos são patógenos importantes em infecções hospitalares (MCCARTNEY, 1992). Este tipo de infecção causa significante morbidade e mortalidade nos pacientes. O S. aureus vem sendo reconhecido como patógeno importante e é também o causador mais comum das infecções hospitalares (PERL & GOLUB, 1998).

FARIAS et al. (1997) avaliaram o padrão de sensibilidade de cepas de S. aureus oxacilina-susceptíveis e oxacilina-resistentes (ORSA) a agentes antimicrobianos comumente utilizados em infecções causadas por estes patógenos.

As cepas (117) foram isoladas de vários hospitais em São Paulo, Campinas e João Pessoa. A concentração inibitória mínima foi obtida para 24 agentes antimicrobianos, incluindo beta-lactâmicos, fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, macrolídeos, etc. Os resultados mostraram uma alta e preocupante taxa de resistência entre as cepas de S. aureus obtidos nos hospitais brasileiros, demonstrando que poucas drogas podem ser efetivas contra doenças infecciosas provocadas por este microrganismo.

Desta forma, os estudos que visam o tratamento de doenças infecciosas provocadas por estafilococos, particularmente S. aureus, sensíveis ou não aos beta-lactâmicos, tendem a se tornar cada vez mais importantes, porque as cepas resistentes são de difícil controle.

Os extratos vegetais usualmente apresentam baixo custo, são mais facilmente aceitos pela população e não envolvem grande investimento inicial para sua produção. Além disso, a Portaria 971 (03 de maio de 2006), a qual aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no SUS, contempla a fitoterapia, como prática desejável nas políticas de saúde públicas brasileiras (Diário Oficial da União, 2006).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Antibióticos

Quando Alexandre Fleming, em 1928, descobriu a Penicilina, deu-se inicio a um marco na história cientifica e mundial, a era dos antibióticos. Estes são substâncias químicas que podem ser derivadas a partir de organismos vivos (fungos e bactérias), ou por meios semi-sintéticos, tendo a função de inibir o crescimento de microrganismos patogênicos e eventualmente destruí-los (FONSECA & FONSECA, 1982).

Os antibióticos de origem natural e seus derivados semi-sintéticos são a maior parte dos antibióticos em uso clínico podendo ser classificados em β-lactâmicos (penicilinas, cefalosporinas, carbapeninas, oxapeninas e monobactamas), tetraciclinas, aminoglicosídeos, macrolídeos, peptídicos cíclicos (glicopeptídeos, lipodepsipeptídeos), estreptograminas, entre outros (lincosamidas, cloranfenicol, rifamicinas etc). Já os antibióticos de origem sintética são classificados m sulfonamidas, fluoroquinolonas e oxazolidinonas (PATRICK, 1995; ABRAHAM, 2003). Nessa revisão, iremos nos ater aos β-lactâmicos, em especial as penicilinas, importantes para esse estudo, e que será abordado em um tópico especifico.

2.2 Farmacologia dos Antibióticos

De acordo com a ação biológica, podemos classificar os antibióticos em Bactericidas e Bacteriostaticos. O primeiro grupo causa a morte dos microarganismos sensíveis a ele, já os bacteriostáticos, promovem a inibição do crescimento e multiplicação dos microrganismos sensíveis. As penicilinas, mais precisamente a amoxicilina, apresenta ação bactericida (ANDRADE, 2006).

Ainda segundo ANDRADE (2006) o espectro de ação parece ser a melhor maneira de classificar os antibióticos do ponto de vista médico e odontológico, pois essa classificação indica a eficácia de cada droga contra determinadas espécies de microrganismos. As penicilinas G e V, macrolídeos, lincosaminas, rifamicina e vancomicina, tem ação principal, sobre as bactérias Gram-positivas. Já os aminoglicosides e as floxacinas, possuem ação eficaz contras bactérias Gram-negativas. Os antibióticos que produzem efeitos tanto em Gram-positivas como em Gran-negativas são: amoxicilina, ampicilina, cefalosporinas, tetraciclinas e

clorofenicol, existindo também as drogas que atuam contra bactérias anaeróbicas, encaixando-se nessa categoria principalmente o metronidazol.

2.3. Mecanismo de ação dos antibióticos

Devido a sua complexidade, o mecanismo de ação dos antibióticos ainda não foram totalmente compreendidos, para isso pesquisas são constantemente realizadas (ANDRADE, 2006).

Os antibióticos podem atuar de formas distintas sobre a célula das bactérias, sendo elas: sobre a parede celular; a membrana citoplasmática; na síntese de proteínas e na síntese de ácidos nucleicos.

Antibióticos que atuam na síntese da parede celular; estrutura exclusiva da célula bacteriana (envolvoltório que confere forma, proteção, sustentação, e manutenção da sua hipertonicidade interna) atuam no momento de crescimento da bactéria, isto é, momento em que ocorre a formação dessa estrutura, produzindo assim efeito bactericida, ou seja, causando a morte do microrganismo. Nessa categoria se encaixam as penicilinas e cefalosporinas (MIZIARA, 1998).

Outro tipo de antibiótico são os que atuam interferindo a permeabilidade da membrana citoplasmática. Esta estrutura se encontra abaixo da parede celular e atua regulando as trocas metabólicas do microrganismo com o meio extracelular, tendo a função de barreira osmótica. Os antibióticos atuam desorganizando a estrutura e alterando a permeabilidade, tendo como consequência, também o efeito bactericida (OLIVEIRA et al., 2010).

Os antibióticos que atuam impedindo a síntese de proteínas podem atuar por meio de dois mecanismos: dificultando a tradução da informação genética (como exemplo podemos citar; cloranfenicol, tetraciclina e eritromicina) apresentando efeito bacteriostático, ou seja, inibindo o crescimento e a multiplicação do microrganismo. O outro mecanismo conhecido é a indução da formação de proteínas defeituosas, (como por exemplo: estreptomicina e gentamicina) apresentando ação bactericida nesses casos (ANDRADE, 2006).

E por fim, os antibióticos que atuam na síntese de ácido nucleico, podendo atuar na síntese de DNA, prejudicando a replicação da informação genética, como

os antibióticos utilizados nas neoplasias malignas da cavidade bucal (Sistema ABC: Atriamicina, Bleomicina e Cisplatina), apresentando efeito bactericida. Ou atuar na síntese do RNA, prejudicando nesse caso a transcrição da informação genética por bloqueio da enzima RNA - Polimerase. O efeito também é bactericida e como exemplo, podemos citar a mitomicina, indicado para o tratamento de neoplasias malignas (BARRETO & PEREIRA, 2006).

2.4 Antibióticos na Odontologia

Como profissional de saúde, o cirurgião-dentista tem por obrigação conhecer os aspectos farmacológicos dos medicamentos que prescreve, devendo também analisar criticamente a bibliografia oferecida pelos laboratórios farmacêuticos, bem como os resultados apresentados pelo uso do medicamento (CASTILHO et al.,1999).

A cavidade bucal apresenta-se como um ambiente ideal para o crescimento de microrganismos, tendo sido identificadas cerca de 500 espécies bacterianas, com diversas características morfológicas e bioquímicas (MOENNING et al., 1989).

As infecções bacterianas bucais que acometem o periodonto e a polpa dental contam com a participação de microrganismos aeróbicos, anaeróbicos facultativos e anaeróbios estritos, sendo difícil encontrar infecções que apresentem apenas um tipo de microrganismo como causador, tornando a dinâmica das infecções bastante complicada. Porém, mesmo com essa diversidade de microrganismos, as infecções bucais costumam ocorrer somente devido ao acúmulo de placa dental ou necrose dos tecidos pulpares (ANDRADE, 2006).

A profilaxia antibiótica previamente ao tratamento odontológico cirúrgico não é indicada na maioria dos casos quando não se observa sinais que indiquem infecção, em pacientes imunocompetentes e que não apresentam possibilidade de infecções à distância, mesmo assim, muitos cirurgiões- dentistas, em uma conduta inadequada acabam prescrevendo antibióticos de forma indiscriminada, na tentativa de prevenir a contaminação da ferida cirúrgica ou algum tipo de infecção pós-operatória. Essa pratica, na sua maioria, não possui embasamento cientifico algum (PALLASCH & SLOTS, 1996).

Ainda Segundo ANDRADE (2006), tratando-se de infecções bacterianas já presentes, o profissional deve ter como estratégia principal, a remoção da causa, pois apenas o uso de antibióticos é ineficaz para erradicar a infecção quando não se intervém no foco da infecção. Sendo assim, os antibióticos devem ser considerados apenas como coadjuvantes na terapêutica das infecções odontológicas, destruindo os microrganismos através da ação bactericida ou apenas impedindo sua reprodução pela ação bacteriostática. Lembrando que o antibiótico irá somente limitar o processo infeccioso, dando condições para que o mecanismo de defesa imunológica do hospedeiro possa eliminar os agentes causais de uma maneira mais rápida e eficaz.

Os antibióticos comumente usados na Odontologia são:

- Penicilinas: de extrema relevância nesse estudo, serão abordadas de maneira mais minuciosa nos próximos tópicos. Apresentam-se como primeira escolha no tratamento de infecções orofaciais agudas, e também sendo também muito indicadas na profilaxia antibiótica, quando esta se faz necessária (ANDRADE,2006);
- Cefalosporinas: drogas de primeira escolha no tratamento de infecções odontológicas em nível ambulatorial. Seu espectro de ação é maior que das penicilinas, porém não coincide com as bactérias mais presentes na maioria das infecções odontológicas agudas (ANDRADE, 2006);
- Clindamicina: faz parte do grupo das licosaminas, na odontologia é selecionada quando há infecções mais avançadas (ANDRADE,2006) como osteíte purulenta ou outras infecções ósseas causadas por microorganismos anaeróbicos (OLIVEIRA, 1999), servem também para infecções que não podem ser erradicadas pela penicilina ou antibióticos macrolídeos como a eritromicina (FOUNTOURA & MEDEIROS, 1999) e também nos casos de alergia às penicilinas;
- Eritromicina: bacteriostático da família dos macrolideos, sendo o segundo mais frequentemente usado depois dos derivados da penicilina; é a alternativa para pacientes alérgicos à penicilina em infecções de pequena ou média gravidade (YAGILA & NEIDLE, 2000). Mostra-se eficaz contra microrganismos gram-negativos e aeróbios.

- Metronidazol: muito eficaz contra bacilos anaeróbicos Gram- negativos, sendo assim, apresenta-se como um ótimo antibiótico para o tratamento de infecções agudas, como pericoronarites, abcessos periapicais e GUNA (ANDRADE, 2006). Na maioria dos casos, admistrado associadamente às penicilinas ou cefalosporinas (YAGILA & NEIDLE, 2000);

- Tetraciclinas: efetivas em muitas espécies de anaérobios, porém, tem sua eficácia progressivamente diminuída em virtude do aparecimento de espécies resistentes (ANDRADE, 2006). A utilização na terapêutica odontológica é limitada para o tratamento de infecções orodentais agudas, sendo mais comumente empregada em alguns casos de doença periodontal, tal como, a periodontite juvenil localizada. Sua principal vantagem no tratamento desta doença é a capacidade de se concentrar de 5 a 7 vezes mais no fluido do sulco gengival do que no plasma (SALLUM et al., 1996), além de apresentar uma boa substantividade e inibir da reabsorção óssea.

2.5 Penicilinas

As penicilinas são compostos naturais e semi-sintéticos, apresentando semelhança com relação ao núcleo molecular, o ácido 6-aminopenicilânico e diferindo na ação antibacteriana. Juntamente com as cefalosporinas, fazem parte dos antibióticos betalactâmicos, pois possuem em sua estrutura química, um anel beta-lactâmico (Figura 1). São Bactericidas, podendo apresentar amplo ou largo espectro de ação e agem inibindo a síntese de parede celular das bactérias (ANDRADE, 2006).

Todas as penicilinas possuem o mesmo mecanismo primário de ação, ou seja, inibição das enzimas responsáveis pela ligação cruzada dos polímeros de peptidoglicano durante o último estágio da síntese da parede celular bacteriana (ANDRADE, 2006).

Podem ser divididas em: Benzilpenicilina (penicilina G) e fenoximetilpenicilina (penicilina VV); Ampicilina e amoxicilina (aminopenicilinas); oxacilina, cloxacilina e dicloxacilina (penicilinase- resistentes); carbenicilina e ticarcilina (pseudomonicidas); azloxilina, mezlocilina e piperacilina,

No que diz respeito ao espectro antibacteriano, a penicilina G, V e os derivados da penicilina penicilinase-resistentes são considerados antibióticos de espectro estreito, pois, quando administrados nas doses habituais, afetam principalmente microrganismos aeróbicos e facultativos Gram-positivos, alguns anaérobios e espiroquetas. Já os demais derivados das penicilinas exibem espectro ampliado de atividade, incluindo numerosos bacilos Gram-negativos (ANDRADE, 2006).

Para o presente estudo, a amoxicilina é o antibiótico de relevância. Segundo ANDRADE (2006) seu espectro de ação é similar ao das penicilinas G e V, sendo, discretamente menos ativas com relação aos cocos Gram-positivos, todavia, dispõem de uma atividade adicional contra cocos e bacilos Gram-negativos. Também não são eficazes contra bactérias produtoras de beta-lactamases.

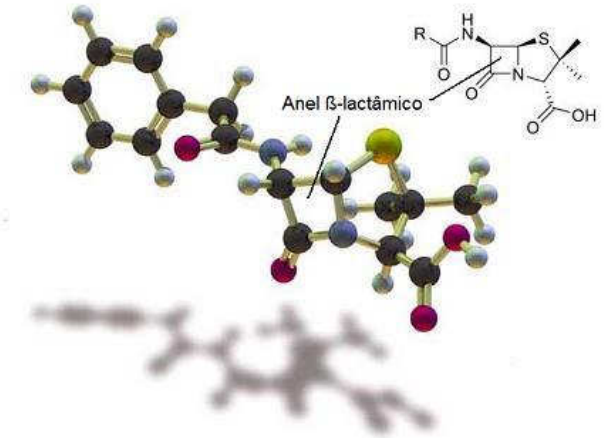

Figura1: Esquema representativo da molécula de penicilina contendo o anel beta-lactâmico.

2.6 Resistência Bacteriana

Alguns anos após a descoberta da penicilina, com os adventos da Segunda Guerra Mundial, foi indispensável que se estudasse e que se pesquisasse um pouco mais sobre a quimioterapia moderna, pois com a guerra eram inevitáveis os ferimentos e, com eles, as infecções. A penicilina foi então extensamente utilizada contra estafilococos e estreptococos, grandes causadores de pneumonias, infecções aéreas superiores, septicemias etc. A nova droga tinha grande capacidade em dizimar essas infecções e, ainda, atuava de acordo com os princípios da

quimioterapia moderna, ou seja, com toxicidade seletiva (RUSSELL & CHOPRA, 1990).

Então, a resistência à nova droga foi descrita quase que imediatamente. Bactérias produtoras de penicilinase, chamadas hoje de β-lactamases, sobreviviam aos tratamentos e só altas doses efetivamente atingiam sucesso. A partir daí, o desenvolvimento de resistência à penicilina pelo *Staphylococcus aureus*, através da produção de β -lactamase, diminuiu de maneira significativa o uso dessa droga em infecções estafilocócicas, principalmente em pacientes hospitalizados nos quais as cepas resistentes são encontradas antes de sua disseminação à comunidade (HAWKEY, 1988).

Com a descoberta de novos antibióticos, as cepas de *S. aureus* foram tornando-se ainda mais resistentes devido à produção de β -lactamases. Em 1946, apenas 5% das cepas de S.aureus eram produtoras de β -lactamase, atualmente, relatos de 1990 mostraram que cerca de 90% das cepas produzem a enzima (LIVERMORE, 1994).

Em primeiro momento o fenômeno da resistência bacteriana não parecia ser um problema de tanta importância. Sendo temporariamente resolvido com a introdução de novos antibióticos, tais como os aminoglicosídeos, macrolídeos, glicopeptídeos somados à alterações estruturais nos compostos já existentes que refletiam em mudanças de sua atividade e espectro antimicrobiano (GOLD & MOELLERING, 1996). Porém, hoje se conhecem microrganismos multirresistentes, não sensíveis a quaisquer dos antibióticos disponíveis clinicamente, levando rapidamente à morte de pacientes em hospitais. Esses casos estão sendo cada vez mais frequentes, inclusive no Brasil (DALLA COSTA et al.,1998).

As bactérias têm sido classificadas como resistentes ou sensíveis de acordo com dados de CMI (Concentração Mínima Inibitória) e CMB (Concentração Mínima Bactericida). São entendidas como resistentes quando são inibidas *in vitro* só em concentrações superiores àquelas obtidas *in vivo*. Essa relação concentração da droga-inibição de crescimento não deve ser encarada como totalmente verdadeira, visto que o sucesso terapêutico não depende exclusivamente dessa relação, mas, também de fatores que incluem a capacidade da droga em atingir o foco infeccioso,

o comprometimento imunológico do paciente e o alvo da terapia. Dessa forma, um determinado microrganismo é sensível ou resistente apenas quando se observa o sucesso ou insucesso terapêutico, respectivamente (TOWER, 1997).

Ainda segundo TOWER (1997), a resistência de dado microrganismo à determinada droga pode ser classificada inicialmente como intrínseca ou adquirida. A resistência intrínseca é aquela que faz parte das características naturais, fenotípicas do microrganismo, transmitida apenas verticalmente à prole, ou seja, faz parte da herança genética do microrganismo.

ROZENBAUM et al. (2009) relataram um dos primeiros casos de infecção severa causada por MRSA adquirida no meio ambiente, a qual causou infecções graves em uma criança no Rio de Janeiro. FORTES et al. (2008) observaram um paciente que desenvolveu endocardite a partir de uma cepa MRSA também oriunda do meio ambiente. DE CARVALHO et al. (2009) encontraram MRSA em saliva de profissionais de saúde, enquanto que SOUSA JÚNIOR et al. (2009) observaram uma preocupante taxa (41,5%) de prevalência de MRSA em pacientes hospitalizados num hospital maternidade em Natal, RN.

Torna-se importante ainda lembrar que diversos fatores podem contribuir para a ocorrência ou disseminação da resistência bacteriana, dentre os principais encontram-se aqueles relacionados ao hospedeiro e à pressão seletiva gerada pelos agentes antimicrobianos (AZEVEDO, 2005).

Atualmente, o uso indiscriminado e equivocado dos antibióticos ao longo dos anos é considerado um dois maiores agentes de pressão seletiva com relação aos microrganismos (ANDRADE, 2006).

O S. aureus é um microrganismo que possui características particulares de virulência e resistência, observadas principalmente em pacientes hospitalizados, tendo severas consequências, mesmo quando são empregadas terapias antimicrobianas nessas infecções. A disseminação da resistência bacteriana em cepas de S. aureus é de grande importância no que diz respeito à saúde publica, visto que é um microrganismo que desenvolve rapidamente resistência aos antibióticos de uso clínico.

2.7 Atividade antimicrobiana do alho

As plantas medicinais constituem uma rica fonte de novas moléculas a serem exploradas como drogas convencionais no futuro ou ainda como ferramentas bioquímicas para a elucidação de aspectos etiológicos de determinadas patologias que ainda permanecem obscuros (CRAGG & NEWMAN, 2005).

Um dos gêneros frequentemente utilizado e estudado em medicina como antimicrobiano, antigripal, hipocolesterolemiante, entre outros, é o *Allium*, particularmente o *Allium sativum* (alho comum). Existem mais de 600 espécies de alhos encontrados pelo mundo, principalmente na Ásia. A maioria das espécies tem aroma e odor característicos, sendo algumas utilizadas como plantas ornamentais (PINO et al., 2001).

A atividade antimicrobiana de *Allium spp*. vem merecendo destaque na literatura internacional e já se encontra bem documentada (MANTIS et al., 1978; SHELEF, 1984; DOMINGO & LOPES-BREA, 2004). O alho contém vários constituintes químicos biologicamente ativos como aliina, alicina, alinase, S-alil-cisteína e organosulfetos. Aliina é um aminoácido que é convertido em alicina pela enzima aliinaliase quando os bulbos são triturados. Alicina é um precursor de compostos sulfurados que são responsáveis pelo odor e pelas propriedades farmacológicas. Uma vez exposta ao ar, alicina é convertida em dialisdissulfeto, que possui atividade antimicrobiana e a redução pela cisteína poderá romper as ligações dissulfeto em proteínas microbianas. A inibição do crescimento bacteriano e a propriedade bactericida são geralmente atribuídas à alicina (SHELEF, 1984; GONZALES-FANDOS et al., 1994) encontrada no alho, mas outros compostos sulfurados, como ajoene (GROPPO et al. 2007).

Aplicações práticas desta substância, calcadas em sua capacidade de inibição de crescimento e lise bacteriana têm sido estudadas. A alicina na sua forma pura demonstrou atividade antimicrobiana em larga escala contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas e fungos como *Candida albicans* e não albicans e *Aspergillus spp* (ANKRI & MIRELMAN, 1999; DOMINGO & LOPES-BREA, 2004). O estudo de SOHN et al. (2009) mostrou que o alho teve um efeito sinérgico com a ciprofloxacina em modelo de prostatite crônica em ratos.

JUSTIFICATIVA

KAMIYA (1997) argumenta que o uso de drogas antimicrobianas no Japão é extremamente alto. Só em 1994 o custo total da produção delas ficou em 3,38 bilhões de dólares. O uso intensivo de drogas de amplo-espectro, especialmente no tratamento de um crescente número de pacientes idosos e imunocomprometidos, resultou numa emergencial e expansiva resistência nos microrganismos. Um dos principais patógenos identificados dentro desta característica foram cepas MRSA.

Estimativas sobre o número de espécies de plantas e flores em todo o mundo apontam para uma faixa entre 200.000 e 250.000 em 300 famílias e 10.500 gêneros. Segundo a OMS, 80% da população mundial utilizam a medicina popular (principalmente através do uso de plantas medicinais) para suprir as necessidades de assistência médica primária (ELISABETSKY, 1987).

Notavelmente, os efeitos farmacológicos ocasionados por fitoterápicos são oriundos de um ou mais de seus constituintes. Grupos farmacológicos distintos, dentro de uma mesma planta, podem ser responsabilizados pelas várias atividades farmacológicas verificadas em uma só espécie vegetal. Embora a maioria dos pesquisadores tenha tendência a preconizar o uso de princípios ativos das plantas de origem, é possível mostrar através de muitos exemplos, que o uso das plantas pode ser efetivo quando usado in natura ou através de extratos de preparação simples (MATOS, 1997).

O estudo da atividade antimicrobiana de substâncias, tais como o alho, são usualmente realizados *in vitro* e existem poucas evidências da eficácia deles em modelos de infecção *in vivo*. Os modelos de infecção em animais são úteis para prever o comportamento de fármacos, pois a dinâmica da infecção, particularmente em roedores, é similar a dos seres humanos. Os modelos experimentais que utilizam a reação a algum corpo estranho, usualmente implantado via subcutânea e estudam o impacto de fármacos (ou qualquer tratamento) sobre ele, são chamados de modelos *ex vivo*. A implantação de corpos estranhos porosos resulta na encapsulação dos mesmos por tecido granulomatoso ou fibrinoso, sendo a sua cavidade preenchida por fluido tipo exsudato. Este tipo de material permite a difusão de antimicrobianos e a entrada de fagócitos e anticorpos, ocasionando uma

oportunidade para se examinar a efetividade de antimicrobianos conjuntamente com as defesas do hospedeiro.

Estes modelos podem ser válidos para determinação da capacidade de um antimicrobiano de penetrar em locais específicos de infecção; avaliação de sua atividade bactericida, bem como seu efeito na fisiologia e morfologia da bactéria e a possibilidade da ocorrência de seleção ou resistência (RENNEBERG, 1993). Dentre os vários métodos utilizados para indução desta injúria, a implantação de esponjas de policlorovinil (PVC) no dorso de animais, atuando como agente desencadeador tem sido utilizado (BAGLIE et al., 2000; GROPPO, 1996). Esse tecido tem morfologia e sequência de formação bem estudada.

3. PROPOSIÇÃO

A proposição deste estudo foi avaliar o efeito do alho (*Allium sativum*) sobre a ação antibacteriana da amoxicilina em cepas de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistentes em ratos, em modelo *ex vivo.*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais

Os principais materiais utilizados para a realização do presente trabalho foram:

- *Staphylococcus aureus* ATCC 25923;
- esponjas de policlorovinil (PVC) com densidade de 35 kg/m^3, PRO301 – Proespuma Com. e Ind. Ltda;
- suspensão de amoxicilina (Sigma, EUA) triidratada de 60 mg/mL;
- quetamina 100 mg/mL (Dopalen, Vetbrands™);
- xilasina 100 mg/mL (Rompun®, Bayer);
- agulha especial para administração oral, curva, 70x15, Arkansas®

4.2 Animais

Este trabalho foi submetido e aprovado pela comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/UNICAMP (protocolo 2459-1) e só foi realizado após aprovação pela referida comissão.

Foram utilizados 30 ratos (*Rattus norvegicus albinus*, Wistar), adultos jovens (60 dias), machos, pesando entre 150 e 200 g, S.P.F. que foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP.

Após a chegada dos animais à Faculdade de Odontologia de Piracicaba, os animais permaneceram cerca de uma semana, para adaptação, nas dependências do biotério de experimentação da Área de Farmacologia, Anestesiologia e Terapêutica e receberam, nesta fase de adaptação e também durante a fase experimental, ração balanceada comercial e água ad libitum.

4.3 Preparo do extrato de *Allium sativum*

O extrato à base de *Allium sativum* foi obtido como previamente descrito por GROPPO et al. (2002). Para isso, amostras de alho foram obtidas no mercado local, depois de descascar cerca de 100 g dos bulbos, os mesmos foram triturados em um liquidificador por 10 min, com adição de 100 mL de água destilada. O extrato obtido foi então filtrado e centrifugado em quatro etapas:

1) Filtragem em sistema filtrante a vácuo simples com papel filtro para remoção das partículas mais grosseiras do extrato;
2) Centrifugação a 10.000 r.p.m. por 20 minutos (o precipitado foi descartado);
3) Filtragem em sistema filtrante a vácuo com filtro de membrana, no qual o sobrenadante foi filtrado em membrana Millipore tamanho 0,65 µm;
4) O filtrado foi submetido ao terceiro sistema filtrante, no qual foi submetido à esterilização através da passagem por um filtro de membrana de 0,22 µm de diâmetro de poro.

O rendimento deste processo foi de aproximadamente 50%. Desta forma obtivemos uma solução de alho a 50% (p/v), ou seja, 0,5 g/mL.

4.4 Cultura do microrganismo *Staphylococcus Aureus* para infecção do granuloma

Para a manutenção da cepa foram utilizados tubos de ensaio esterilizados com TSB (caldo de tripticaseina) 24 horas antes de sua utilização. Para obtenção do inóculo padrão contendo 108 cfu/mL foram seguidos os seguintes procedimentos:

- foi colhida uma alçada de colônias cultivada em TSB com alça de platina esterilizada;
- os microrganismos foram dispersados em um tubo de ensaio contendo 10 mL de BHI e encubados em aerobiose por 4 a 5 horas a 37 ^{o}C;
- o espectrofotômetro foi calibrado com soro fisiológico e ajustado para 800 nm de comprimento de onda;
- 0,1 mL da dispersão foi diluída em um tubo contendo soro fisiológico até obtenção de uma suspensão bacteriana com densidade óptica de 60% de transmitância.

4.5 Indução de granuloma, infecção do tecido granulomatoso e tratamentos realizados

Foram obtidos, por meio da utilização de um perfurador, discos de esponjas de policlorovinil (PVC) com 12 mm de diâmetro por 5 mm de altura (densidade de 35 kg/m3, PRO301 – Proespuma Com. e Ind. Ltda). Estes foram esterilizados em autoclave, a 120℃ por 15 min.

O tecido granulomatoso foi obtido por meio do implante de quatro discos de esponja (descritos acima) no tecido subcutâneo no dorso dos animais, de acordo com a técnica descrita previamente por GROPPO et al. (2000).

Após a indução da anestesia geral nos animais (administração intramuscular de quetamina e xilasina) foi realizada tricotomia da região dorsal mediana e anti-sepsia com solução de álcool iodado a 2% para a realização da incisão de aproximadamente 1 cm, perpendicularmente à coluna vertebral, na derme, sem invasão de tecido muscular, com tesoura de ponta reta fina. Em seguida, foi feita a divulsão do tecido subcutâneo com tesoura de ponta romba; e introdução das esponjas, o mais distante possível da incisão, em posições laterais, uma à esquerda e outra à direita, duas em direção à cabeça e outras duas em direção à cauda. Seguida da sutura com dois pontos simples, com fio de algodão número zero.

Após 14 dias da implantação das esponjas, foi realizado a infecção dos tecidos granulomatosos (de acordo com a técnica previamente descrita por GROPPO et al., 2004) através da introdução de 0,5 mL de uma suspensão bacteriana de $1x10^{10}$ de MRSA ATCC 33591, em solução de cloreto de sódio a 0,9%, previamente ajustada por espectrofotometria, em cada um dos quatro tecidos granulomatosos. Este procedimento foi efetuado em todos os animais e este dia foi anotado como dia zero da infecção.

Para a administração oral das drogas nos animais foi utilizada uma agulha especial (Agulha para administração oral, curva, 70X15, Arkansas), acoplada à seringa hipodérmica.

Decorridos 24h da infecção, os animais foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos e o tratamento foi realizado de acordo com a Tabela 1:

Tabela 1. Distribuição dos grupos do estudo.

Divisão dos grupos	Tratamento	Período de sacrifício (em horas)	N
1) Grupo controle 0h	Dose única de soro fisiológico (1 ml/kg)	0	6
2) Grupo controle 24h	Soro fisiológico (1 ml/kg) a cada 8 horas	24	6
3) Grupo alho	Extrato de *A. sativum* (100 mg/kg) a cada 8 horas	24	6
4) Grupo amoxicilina	Amoxicilina em suspensão (50 mg/kg) da a cada 8 horas	24	6
5) Grupo alho+amoxicilina	Amoxicilina em suspensão (50 mg/kg) e extrato de alho (100 mg/kg) a cada 8 horas	24	6

Após a conclusão dos tratamentos (0 ou 24 horas após os tratamentos realizados), os animais foram novamente anestesiados, exsanguinados através da secção do plexo carotídeos e então os tecidos granulomatosos infectados foram cuidadosamente retirados, mediante técnica cirúrgica. Em seguida, os animais foram sacrificados através do aprofundamento da anestesia.

As amostras dos granulomas foram colocadas em diferentes tubos tipo *falcon*, contendo 10 mL de solução de cloreto de sódio esterilizada, previamente pesado.

Após nova pesagem para determinar o peso do granuloma, as amostras foram submetidas à agitação em vortex por 5 minutos. Após este período, foram colhidas alíquotas de 10 µL e espalhadas, através de uma alça de vidro em L, em placas de Petri de 5 cm de diâmetro contendo 25 mL de meio de cultura Salt Manitol Agar.

Todas as placas foram levadas à estufa a 37 ℃, durante 18 horas para incubação. Decorrido este período, foram submetidas ao procedimento de contagem manual.

Analise estatística.

Os resultados das contagens de colônias provenientes dos granulomas foram comparados com o grupo controle, através do teste de Kruskal-Wallis, com nível de significância de 5%, com auxílio do pacote estatístico BioEstat 5.

5. RESULTADOS

Os pesos dos fibromas apresentaram pouca variação após a infecção com o S. aureus ATCC 33591. O tratamento utilizando a amoxicilina 50 mg/Kg apresentou massa significativamente inferior ($p<0.05$) em relação ao grupo controle 0h. Nos demais grupos não houve diferença estatística (Figura 1).

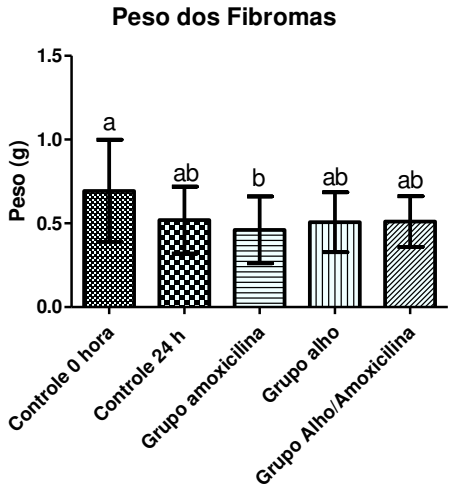

Figura 1: Média do peso dos fibromas entre os grupos. Letras diferentes mostram diferença estatística. $p< 0,05$ (Kruskal-Wallis / Student-Newman Kells).

Em relação à contagem de células bacterianas provenientes dos fibromas observou-se um número de UFC/mL mais elevado nos controles 0h e 24h. Apesar da contagem de células ter sido menor no grupo amoxicilina, não houve diferença estatística em relação aos controles ($p<0.05$). Já os tratamentos com o alho e a combinação de alho e amoxicilina reduziram significativamente o número de UFC/mL com relação aos controles 0h e 24h ($p<0.05$), porém não ocorreu diferença significativa com relação ao grupo amoxicilina ($p>0.05$).

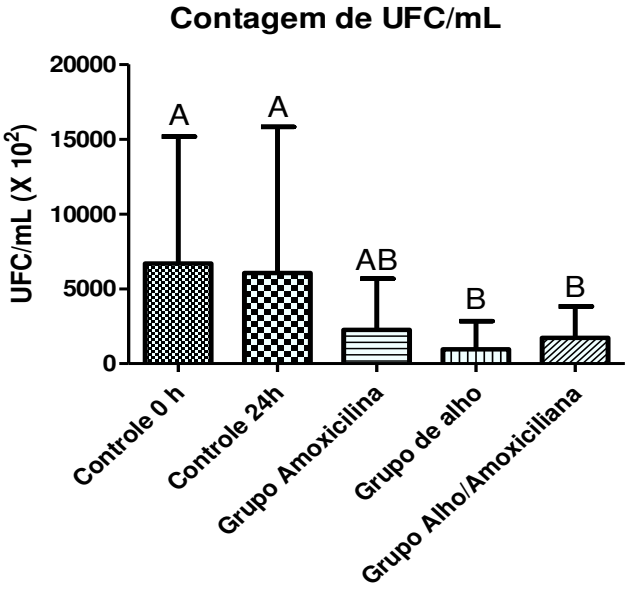

Figura 2: Média da contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) entre os grupos. Letras diferentes mostram diferença estatística. $p < 0,05$ (Kruskal-Wallis / Student-Newman Kells).

6. DISCUSSÃO

O *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina é uma espécie de bactéria responsável por muitas infecções adquiridas no ambiente hospitalar (GIBBONS, 2008). Este microrganismo pode produzir β-lactamase, enzima responsável pela inativação da penicilina através da hidrolisação do anel β-lactamico do antibiótico (LOWY, 1998; COFFEY et. al., 1995). A resistência a meticilina confere resistência a todas as penicilinas e cefalosporinas. Esta resistência é devido a presença do gene mec que codifica as proteínas de ligação a penicilina (PBPs) (HIRAMATSU et. al., 1997; SCHABERG & ZERVOS, 1986). Alteração nas isoformas de PBPs como as PBP 1a e 2b tem implicado no desenvolvimento resistência a penicilina e cefalosporinas (HIRAMATSU et. al., 1997; CHAMBERS, 1996). A ocorrência de MRSA e outras cepas multirresistentes tem levado a necessidade do descobrimento de novas classes de antimicrobianos (GIBBONS, 2004).

O uso de plantas medicinais tem sido sugerido como “antibióticos alternativos” na tentativa de combater bactérias resistentes (MATHEWS et al., 1999). Fitoterápicos e produtos naturais em geral possuem uma grande variedade de compostos bioativos, os quais podem ser estruturalmente distintos dos antimicrobianos convencionais, exibindo novos modos de ação (GIBBONS, 2008). Na etnobotânica, existem muitos exemplos de plantas que são usadas na forma tópica ou sistemicamente para tratar infecções bacterianas, porém ainda não há nenhum antimicrobiano derivado de planta utilizado clinicamente (MAGASSOUBA et al., 2007).

As propriedades medicinais do alho têm sido amplamente estudadas, onde os seus benefícios para a saúde como hipocolesterolêmico, hiperlipidêmico, anti-hipertensivo, antidiabético, antitrombótico, anti-hiperhomocisteinemia, antimicrobiano, antioxidante, anticarcinogênica, antimutagênica, antiasmática, imunomoduladora e pró-bióticasantitrombótico, antiarrítmico e anticâncer tem sido reconhecidos (AMAGASE et al., 2001; MARTÍNEZ et al., 2007; CASELLA et al., 2012; MERIGA et al., 2012).

A atividade antimicrobiana do alho sobre *S. aureus* já foi reportado em modelos *in vivo* e *in vitro* (GONZÁLES-FANDOS et al., 1994). O óleo essencial do *Allium sativum* foi capaz de inibir o crescimento de cepas de MRSA *in vitro* (TSAO &

YIN, 2001). Produtos naturais à base de alho mostraram-se capazes de afetar a sensibilidade tanto de *S. aureus* quanto de *E. coli* em modelo *in vitro* (WARD et al., 2002). Além disso, recentemente o alho também apresentou atividade antimicrobiana contra outras cepas bacterianas, mesmo aquelas resistentes provenientes de hospital, dentre elas o S. aureus (GULL et al., 2012). No presente estudo, a atividade antimicrobiana do alho contra cepas de *S. aureus* resistentes foi confirmada em modelo *ex vivo*, visto que o grupo tratado com o alho não diferiu estatisticamente do grupo tratado com amoxicilina.

A propriedade antimicrobiana do alho tem sido atribuída à presença de alicina, que pode afetar o crescimento de diversas bactérias. FUJISAVA et al., (2009) comparou a ação do extratos aquoso de alho com a alicina isoladamente e também com os antimicrobianos streptomicina e vancomicina contra *S. aureus* e *E. coli in vitro*. O extrato aquoso de alho mostrou-se mais potente que o composto de alicina isolado, porém foram menos efetivos que os antimicrobianos testados. Também não se verificou ação sinérgica entre a alicina com a streptomicina e vancomicina. O extrato hidroalcoólico de *A. sativum* também apresentou ação sinérgica limitada quando combinado com antibióticos (BETONI et al., 2006). A hipótese de sinergismo do extrato aquoso de alho com a amoxicilina não foi confirmada neste estudo, onde a contagem de células com os animais que receberam alho e amoxicilina não diferiu estatisticamente do grupo alho e do amoxicilina administradas isoladamente.

Em estudos *in vivo* utilizando camundongos BALB/cA foram testados os extratos aquosos *A. sativum* e outros dois compostos sulfurados, o dialil sulfeto e o dialil disulfeto contra cepas de MRSA isoladas de ambientes hospitalares. O alho assim como os outros dois compostos sulfurados demonstraram muitas funções protetivas contra a infecção por MRSA. Foram capazes de reduzir o número de UFC/mL, suprimir a infecção induzida pela elevação da fibronectina e interleucina-6 e diminuir o dano oxidativo induzido por MRSA (TSAO et al., 2003). No modelo empregado neste trabalho, utilizando a infecção dos fibromas, também foi possível observar uma redução significativa no número de células nos grupos que receberam tratamentos com extrato aquoso de alho em relação aos grupos controles.

7. CONCLUSÃO

O extrato aquoso do *A. sativum* demonstrou capacidade de reduzir o número de UFC/mL nos fibromas infectados por *S. aureus* resistente ATCC 33591, isoladamente ou quando aplicado em conjunto com a amoxicilina. Novos estudos devem ser conduzidos em outros modelos animais para verificar a efetividade do tratamento, uma vez que, apesar de reduzir o número de colônias bacterianas, os grupos tratados com alho não apresentaram diferença em relação ao grupo tratado apenas com amoxicilina, indicando que o tratamento a base de extrato de alho pode não ser suficientemente efetivo.

REFERÊNCIAS*

1) ABRAHAM, D. J. Burger's Medicinal Chemistry & Drug Discovery. Chemotherapeutic Agents, John Wiley & Sons: San Francisco. vol. 5. 2003.

2) AMAGASE, H., PETESCH, B.L., MATSUURA, H., KASUGA, S., ITAKURA, Y. Intake of garlic and its bioactive components. J Nutr 131: 955S–962S. 2001.

3) ANDRADE, E.D. Terapêutica Medicamentosa em Odontologia. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas; 2006.

4) ANKRI, S., MIRELMAN, D. Antimicrobial properties of allicin from garlic. Microbes Infect. 1(2):125-9. 1999.

5) AZEVEDO, F.M. Microrganismos multirresistentes. In: Oliveira AC. Infecções hospitalares: epidemiologia, prevenção e controle. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2005. p. 341-47.

6) BAGLIE, S., GROPPO, F.C., FILHO, T.R., Tissue pharmacokinetics of amoxicillin. An experimental design in rats. Braz J Infect Dis. 4(4):197-203. 2000.

7) BARRETO, R.C., PEREIRA, G.A.S. Farmacoterapia na clínica odontológica. 1. ed. João Pessoa: Editora Universitária; 2008.

8) BETONI, J.E., MANTOVANI, R.P., BARBOSA, L.N., Di STASI, L.C., FERNANDES JUNIOR, A. Synergism between plant extract and antimicrobial drugs used on Staphylococcus aureus diseases. Mem Inst Oswaldo Cruz. 101(4):387-90 2006.

9) CASELLA, S., LEONARDI, M., MELAI, B., FRATINI, F., PISTELLI, L. The Role of Diallyl Sulfides and Dipropyl Sulfides in the In Vitro Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Garlic, Allium sativum L., and Leek, Allium porrum L. Phytother Res. doi: 10.1002/ptr.4725. [Epub ahead of print]. 2012.

* De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseada na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviaturas dos periódicos em conformidade com o Medline.

10) CASTILHO, L.S., PAIXÃO, H.H., PERINI, E. Prescrição de medicamentos de uso sistêmico por cirurgiões dentistas, clínicos gerais, Revista de Saúde Pública, 3(33) 287-94. 1999.

11) CHAMBERS, H.F. Methicillin resistance in staphylococci: molecular and biochemical basis and clinical implication. Clin. Microbiol. Rev. 10: 781:791. 1997.

12) COFFEY, T.J., DOWSON, C.G., DANIELS, M., SPRATT, B.G. Genetics and molecular biology of beta-lactam-resistant pneumococci. Microb Drug Resist. Spring;1(1):29-34. 1995.

13) CRAGG, G.M., NEWMAN, D.J. Plants as a source of anti-cancer agents. J Ethnopharmacol. 22;100(1-2):72-9. 2005.

14) DALLA COSTA, L.M., SOUZA, D.C., MARTINS, L.T., ZANELLA, R.C., BRANDILONE, M.C., BOKERMANN, S., SADER, H.S., SOUZA, H.A. Vancomycin-Resistant Enterococcus faecium: First Case in Brazil. Braz J Infect Dis. 2(3):160-163. 1998.

15) de CARVALHO, M.J., PIMENTA, F.C., HAYASHIDA, M., GIR, E., DA SILVA, A.M., BARBOSA, C.P., CANINI, S.R., SANTIAGO, S. Prevalence of methicillin-resistant and methicillin-susceptible S. aureus in the saliva of health professionals. Clinics (Sao Paulo). 64(4):295-302. 2009.

16) DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Ministério da Saúde. Edição n. 84 de 04/05/2006. Publicação da Portaria n. 971, de 3 de maio de 2006, Aprova A Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema único de Saúde.

17) DOMINGO, D., LOPEZ-BREA, M. Plants with antimicrobial action Rev Esp Quimioter. 16(4):385-93. 2004.

18) ELIZABETSKY, E. Pesquisas em plantas medicinais. Ciência e Cultura, v.39, n.8, p.697-702, Ago. 1997.

19) FARIAS, W.V. SADER, H.S., LEME, I.L., PIGNATARI, A.C. Sensitivity pattern of 117 clinical isolates of Staphylococcus aureus from 12 hospitals. Rev Assoc Med Bras. 43(3):199-204. 1997.

20) FONSECA, M.B., FONSECA, A.L. Introdução ao estudo dos antibióticos. OM. 11(12):45 47. 1982.

21) FORTES, C.Q., ESPANHA, C.A., BUSTORFF, F.P., ZAPPA, B.C., FERREIRA, A.L., MOREIRA, R.B., PEREIRA, N.G., FOWLER, V.G. JR, DESHMUKH, H. First reported case of infective endocarditis caused by community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus not associated with healthcare contact in Brazil. Braz J Infect Dis. 12(6):541-3. 2008.

22) FONTOURA, R., MEDEIROS, P.J. Antibioticoterapias nas infecções Odontogênicas. Revista Brasileira de Odontologia,Rio de Janeiro. V.56, n.5, Set/Out. 1999.

23) FUJISAWA, H., WATANABE, K., SUMA, K., ORIGUCHI, K., MATSUFUJI, H., SEKI, T., ARIGA, T. Antibacterial potential of garlic-derived allicin and its cancellation by sulfhydryl compounds. Biosci Biotechnol Biochem. 73(9):1948-55. 2009.

24) GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. Nat. Prod. Rep. 21: 263–77. 2004.

25) GIBBONS, S. Phytochemicals for bacterial resistance--strengths, weaknesses and opportunities. Planta Med. 74(6):594-602. 2008.

26) GOLD, H.S., MOELLERING, R.C. Jr. Antimicrobial-Drug Resistance. N Engl J Med. 355 (19): 1445-53, 1996.

27) GONZALEZ-FANDOS, E., GARCIA-LOPEZ, M.L., SIERRA, M.L., OTERO, A. Staphylococcal growth and enterotoxins (A-D) and thermonuclease synthesis in the presence of dehydrated garlic. J Appl Bacteriol. 77(5):549-52. 1994.

28) GROPPO, F.C., MATTOS-FILHO, T.R., DEL-FIOL, F.S. Bioassay of amoxicillin in rats. Biol Pharm Bull. 23(9):1033-5. 2000.

29) GROPPO, F.C., RAMACCIATO, J.C., SIMÕES, R.P., FLÓRIO, F.M., SARTORATTO, A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. Int Dent J. 52(6):433-7. 2002.

30) GROPPO, F.C., RAMACCIATO, J.C., MOTTA, R.H.L., FERRARESI, P.M., SARTORATTO, A. Antimicrobial activity of garlic against oral streptococci. Int J Dent Hygiene (5):1-8. 2007.

31) GROPPO, F.C., SIMÕES, R.P., RAMACCIATO, J.C., REHDER, V., DE ANDRADE, E.D., MATTOS-FILHO, T.R. Effect of sodium diclofenac on serum

and tissue concentration of amoxicillin and on staphylococcal infection. Biol Pharm Bull. 27(1):52-5. 2004.

32) GROPPO, F.C. Influência da evolução do tecido granulomatoso sobre a biodisponibilidade da amoxicilina. Estudo *ex vivo*, em ratos. Piracicaba, 1996. 70p. Tese (Doutorado em Ciências) - Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas.

33) GULL, I., SAEED, M., SHAUKAT, H., ASLAM, S.M., SAMRA, Z.Q., ATHAR, A.M. Inhibitory effect of Allium sativum and Zingiber officinale extracts on clinically important drug resistant pathogenic bacteria. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 27;11:8. 2012.

34) HAWKEY, P.M. The origins and molecular basis of antibiotic resistance. BMJ. 317: 657-660, 1988.

35) HIRAMATSU, K., HANAKI, H., INO, T., YABUTA, K., OGAM, T., TENOVER, F.C. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical strain with reduced vanocmycin. J. Antimicrob. Chemother. 40: 135-136. 1997.

36) JONES, M.E., DRAGHI, D.C., KARLOWSKY, J.A., SAHM, D.F., BRADLEY, J.S. Prevalence of antimicrobial resistance in bacteria isolated from central nervous system specimens as reported by U.S. hospital laboratories from 2000 to 2002. Ann Clin Microbiol Antimicrob. 25(3):3. 2004.

37) KAMIYA, Y. Experiences and studies on antimicrobial resistance in Japan: useful lessons for developing countries. East Afr. Med. J., Kenya. 74(3)174-176. 1997.

38) KONEMAN, E.W. et al. Introduction to diagnostic microbiology. 2.ed. Philadelphia: J.B. Lippincott Company, 1994.

39) LIVERMORE, D.M. Evolution of b-lactamase inhibitors. Intesive Care Med. 20: S10-S13, 1994.

40) LOWY, F.D. *Staphylococcus aureus* infections. N. Engl. J. Med. 339: 520-532. 1998.

41) MAGASSOUBA, F.B., DIALLO, A., KOUYATÉ, M., MARA, F., MARA, O., BANGOURA, O. et al. Ethnobotanical survey and antibacterial activity of some plants used in Guinean traditional medicine. J. Ethnopharmacol. 114: 44–53. 2007.

42) MANTIS, A.J. et al. The effect of garlic extract on food poisoning bacteria in culture media. I – Staphylococcus aureus. Lebensmittel Wissenchaft und Technologie, 11, 26-28, 1978. In: GONZÁLEZ-FANDOS, E.; GARCÍA-LOPEZ, M.L.; SIERRA, M.L., OTERO, A. Staphylococcal growth and enterotoxins (A-D) and thermonuclease synthesis in the presence of dehydrated garlic. J. Appl. Bacteriol, 77:549-552, 1994.

43) MARTINEZ, M.A., CORZO, N., VILLAMIEL, M. Biological properties of onions and garlic. Trends Food Sci Tech. 18: 609-25. 2007.

44) MATHEWS, H.B., LUCIER, G.W., FISHER, K.D. Medicinal herbs in the United States: research needs. Environ Health Perspect. 107:773–8. 1999.

45) MATOS, F.J.A. Living pharmacies. Ciência e Cultura, v.49, n.5-6, p.409-412, Sep-Dec. 1997.

46) MCCARTNEY, A.C. Changing trends in infective endocarditis. J. clin. Path., London, 45(11):945-948. 1992.

47) MERIGA, B., MOPURI, R., MURALIKRISHNA, T. Insecticidal, antimicrobial and antioxidant activities of bulb extracts of allium sativum. Asian Pac J Trop Med. 5(5):391-5. 2012.

48) MIZIARA, I.D. Curso Prático de Antibioticoterapia/ O uso da antibioticoterapiano tratamento das doenças bucais. JBC. 2(7):57-67, 1998.

49) MOENNING, J.E., NELSON, C.L., KOHLER, R.B. The microbiology and chemotherapy of odontogenic infections. J Oral Maxillofac Surg; 47: 976-85. 1989.

50) OLIVEIRA, J.C. Antibióticos em Endodontia. Revista Brasileira de Odontologia, Rio de Janeiro. v. 56, n.3, p.134-138, 1999.

51) PALLASCH, T.J., SLOTS, J. Antibiotic prophylaxis and medically compromised patient. Periodontol. 1996;10:107-38. 2000.

52) PATRICK, G. L. An Introduction to Medicinal Chemistry, Oxford University Press: New York. cap.16. 2005.

53) PERL, T.M. & GOLUB, J.E. New approaches to reduce Staphylococcus aureus nosocomial infection rates: treating S. aureus nasal carriage. Ann. Pharmacother., 32(1):S7-S16. 1998.

54) PINO, J.A., FUENTES, V., CORREA, M.T. Volatile constituents of Chinese chive (Allium tuberosum Rottl. ex Sprengel) and rakkyo (Allium chinense G. Don). J Agric Food Chem. 49(3):1328-30. 2001.

55) RENNEBERG, J. Definitions of antibacterial interactions in animal infection models. J. Antimicrob. Chemother. 31:167-175. [Supplement D] 1993.

56) ROZENBAUM, R., SAMPAIO, M.G., BATISTA, G.S., GARIBALDI, A.M., TERRA, G.M., SOUZA, M.J., VIEIRA, E.N., SILVA-CARVALHO, M.C., TEIXEIRA, L.A., FIGUEIREDO, A.M. The first report in Brazil of severe infection caused by community-acquired methicillin-resistant Staphylococcus aureus (CA-MRSA). Braz J Med Biol Res. 42(8):756-60. 2009.

57) RUSSELL, A.D., CHOPRA, I. In Understanding antibacterial action and resistance, 1st ed. Ellis Horwood, London, 1990.

58) SALLUM, W., JUNIOR, F.H., TOLEDO, S. et al. Revista Brasileira de Odontologia, Rio de Janeiro. v.53, n.1, p.11-14, 1996.

59) SCHABERG, D.R., ZERVOS, M.J. Intergeneric and interspecies gene Exchange in gram-positive cocci. Antimicrob. Agents. Chemother. 30: 817-822. 1986.

60) SHELEF, L.A. Antimicrobial effects of spices. Journal of Food Safety. 6:29-44. 1984.

61) SOHN, D.W., HAN, C.H., JUNG, Y.S., KIM, S.I., KIM, S.W., CHO, Y.H. Anti-inflammatory and antimicrobial effects of garlic and synergistic effect between garlic and ciprofloxacin in a chronic bacterial prostatitis rat model. Int J Antimicrob Agents. 34(3):215-9. 2009.

62) SOUSA JUNIOR, F.C., NUNES, E.W., NASCIMENTO, E.D., OLIVEIRA, S.M., MELO, M.C., FERNANDES, M.J. Prevalência de Staphylococcus spp meticilina-resistentes isolados num hospital maternidade escola de Natal, Rio Grande do Norte. Rev Soc Bras Med Trop. 42(2):179-82. 2009.

63) TOWNER, K.J. The problem of resistance. In: David Greenwood; Antimicrobial Chemotherapy, 3rd ed. Oxford University Press. Oxford, 1997.

64) TSAO, S.M., HSU, C.C., YIN, M.C. Garlic extract and two diallyl sulphides inhibit methicillin-resistant Staphylococcus aureus infection in BALB/cA mice. J Antimicrob Chemother. 52(6):974-80 2003.

65) TSAO, S.M., YIN, M.C. In-vitro antimicrobial activity of four diallyl sulphides occurring naturally in garlic and Chinese leek oils. J Med Microbiol. 50(7):646-9 2001.

66) WALDVOGEL, F.A. Staphylococcus aureus. In: MANDELL, G.L. et al. Principles and practice of infectious diseases. 3.ed. New York: Churchill Livingstone, 1990. Apud KONEMAN, E.W. et al. Op. cit. Ref. 40.

67) WARD, P.M., FASITSAS, S., KATZ, S.E. Inhibition, resistance development, and increased antibiotic and antimicrobial resistance caused by nutraceuticals. J Food Prot 65: 528– 533. 2002.

68) YAGILA, J., NEIDLE, E. Farmacologia e Terrapêutica para Dentistas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 4 ed. 2000.

Anexo 1

Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA/Unicamp.

UNICAMP

CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

C E R T I F I C A D O

Certificamos que o projeto **"Efeito do extrato de Allium sativum sobre a atividade antimicrobiana da amoxicilina contra cepas de Staphylococcus aureus resistentes à penicilina. Estudo in vivo, em ratos"** (protocolo nº **2459-1**), sob a responsabilidade de **Prof. Dr. Francisco Carlos Groppo / Karina dos Santos Domingues**, está de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotados pela **Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL)** e com a legislação vigente, **LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008**, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o **DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009**.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em **28 de junho de 2011**.

Campinas, 28 de junho de 2011.

Profa. Dra. Ana Maria A. Guaraldo
Presidente

Fátima Alonso
Secretária Executiva

CEUA/UNICAMP
Caixa Postal 6109
13083-970 Campinas, SP – Brasil

Telefone: (19) 3521-6359
E-mail: comisib@unicamp.br
http://www.ib.unicamp.br/ceea/

Anexo 2

Parecer sobre o relatório final de atividades.

PROGRAMA DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA – QUOTA INSTITUCIONAL UNICAMP

(quota de agosto de 2010 a julho de 2011)

PARECER SOBRE RELATÓRIO FINAL DE ATIVIDADES

Bolsista: KARINA DOS SANTOS DOMINGUES – RA 85910

Orientador(a): Prof.(a) Dr.(a) FRANCISCO CARLOS GROPPO

Projeto: Efeito do extrato de Allium sativum sobre a atividade antimicrobiana da amoxicilina contra cepas de Staphylococcus aureus resistentes à penicilina.

PARECER

A graduanda apresentou uma reprovação em disciplina acadêmica durante o período de vigência da bolsa. Contudo, segundo relato do orientador, cumpriu suas atividades de pesquisa. O relatório está bem elaborado e os resultados sugerem uma publicação em revista de bom nível.

Conclusão do Parecer:

APROVAR (SIM)
REFORMULAR (NÃO)
REJEITAR (NÃO)