

Avaliação *in vitro* da associação medicamentosa de extrato bruto de *Allium sativum* L. (alho) com Imipenem e Meropenem frente a cepas sensíveis de *Escherichia coli*

In vitro evaluation of drug association between crude *Allium sativum* L (garlic) extract and Imipenem and Meropenem against sensible *Escherichia coli* strains

Fabio Carramão Narimatsu¹, Sônia Maria Rolim Rosa Lima², Suely Mitoi Ykko Ueda³,
Sílvia da Silva Carramão⁴, Maria Thereza Gamberini⁵

Resumo

Objetivo: Avaliar a susceptibilidade *in vitro* de cepas de *Escherichia coli* ao extrato bruto de *Allium sativum* e sua associação com antibióticos carbapenêmicos (Meropenem e Imipenem), constatando os impactos dessa associação medicamentosa na inibição do crescimento de cepas de *Escherichia coli*. **Método:** Cepas de *E. coli* obtidas de amostras provenientes do laboratório central do Hospital da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo foram semeadas em placas de ágar Müeller-Hinton pelo método de Kirby-Bauer e incubadas por 48 horas. Avaliou-se a suscetibilidade aos antimicrobianos (Meropenem, Imipenem) e ao extrato bruto

de *A. sativum* (EB), líquido obtido por compressão mecânica dos bulbos de alho; e à combinação destes antibióticos associados ao EB nas cepas de *E. coli*. Aferiram-se os halos de inibição formados segundo os critérios do CLSI vigentes e comparadas as atividades em relação à associação com o EB. Comparou-se o desempenho dos antibióticos isolados, do EB isolado e das associações dos antibióticos com o EB empregando-se o teste estatístico de Wilcoxon. **Resultado:** Constatou-se desempenho superior das combinações do EB com os discos dos antibióticos (Imipenem e Meropenem) comparado aos dos discos dos antibióticos isolados e do EB isolado ($p < 0,05$). **Conclusão:** Concluímos que, *in vitro*, o Imipenem e o Meropenem apresentaram sinergismo quando associado ao EB de *A. sativum* frente às cepas testadas.

Descritores: Alho, *Allium*, *Escherichia coli*, Beta-lactamas, Imipenem, Meropenem

Abstract

Objective: *In vitro* evaluation of the susceptibility of *E. coli* strains to the *Allium sativum* crude extract, and the impacts of the association between the crude extract of *Allium sativum* L (garlic) and antibiotics (Meropenem and Imipenem) in the growth inhibition of *E. coli* strains. **Method:** *E. coli* strains were obtained from samples of the laboratory of the Hospital Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo. The strains were grown on Müeller-Hinton agar disks following the Kirby-Bauer method for 48 hours. The susceptibilities of the strains to the antibiotics (Meropenem and Imipenem); to the *A. sativum* crude extract (CEA); and to the association of each antibiotic and the CEA were evaluated. The zone diameter of each of these substances was measured following the CLSI criteria. The performance of the isolated antibiotics and of the associations between CEA and the antibiotics were compared by the Wilcoxon test. **Results:** Against the *E. coli* strains, the combination of CEA with the antibiotic disk displayed superior performance when compared to the isolated disks

1. Acadêmico da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. 4º Ano do Curso de Graduação em Medicina. São Paulo – SP – Brasil

2. Professora Adjunta da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Departamento de Ginecologia e Obstetrícia. São Paulo – SP – Brasil

3. Professora Assistente da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Departamento de Ciências Patológicas. São Paulo – SP – Brasil

4. Professora Instrutora da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Departamento de Ginecologia e Obstetrícia. São Paulo – SP – Brasil

5. Professora Adjunta da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Departamento de Ciências Fisiológicas. São Paulo – SP – Brasil

Trabalho realizado: Faculdade de Ciências Médicas da Faculdade de São Paulo. Departamento de Ciências Patológicas. Departamento de Ciências Fisiológicas. São Paulo – SP – Brasil

Endereço para correspondência: Fabio Carramão Narimatsu. Av. Raimundo Pereira de Magalhães, nº 817- apto 53 C – Vila Anastácio – 05092-040 – São Paulo – SP – Brasil. E-mail: fabionarimatsu@hotmail.com

Agência de Fomento: O acadêmico Fabio Carramão Narimatsu foi contemplado com Bolsa PIBIC de Iniciação Científica pelo Instituto Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) de 2017 a 2018.

of the antibiotics (Imipenem and the Meropenem) and the isolated disk of CEA ($p < 0,05$). **Conclusion:** Against the tested strains of *E. coli*, both Meropenem and Imipenem displayed synergism with the CEA.

Keywords: Garlic, *Allium*, *Escherichia coli*, Beta-lactams, Imipenem, Meropenem

Introdução

O tratamento de infecções bacterianas torna-se cada vez mais complexo à medida que surgem cepas bacterianas resistentes aos antibióticos que se proliferam tanto em ambientes hospitalares quanto na comunidade⁽¹⁻³⁾. Nesse contexto, a utilização de conhecimentos e tradições sobre a cura de doenças com métodos alternativos pode tornar-se uma forte aliada para o encontro de novas opções terapêuticas⁽⁴⁻⁵⁾.

O *Allium sativum* (alho), da ordem *Liliaceae*, é uma planta originada na Ásia Central, que possui uma variedade de substâncias químicas responsáveis por efeitos medicinais. Existem registros com mais de cinco mil anos realizados por populações de hindus, egípcias e gregas que atestam o uso dessa planta para a promoção da saúde⁽⁵⁾. Dentre os benefícios trazidos pelo alho descritos por trabalhos científicos, temos: tratamento de hipercolesterolemia, do diabetes, da artrite reumatóide, da gripe, da prevenção de aterosclerose e do desenvolvimento de tumores, com destaque para os de fígado, além de possuir efeito antibacteriano⁽⁵⁻⁶⁾.

O efeito antimicrobiano é uma de suas propriedades mais interessantes e estudada cientificamente, havendo publicações demonstrando sua eficácia contra certas bactérias patogênicas, como a *Escherichia coli*⁽⁷⁻⁹⁾, *Staphylococcus aureus*⁽⁷⁾, *Pseudomonas aeruginosa*⁽⁷⁾ e *Shigella spp*⁽⁷⁾.

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa, com morfologia de bacilo e anaeróbia facultativa. Pode estar presente na microbiota normal do trato gastrointestinal de indivíduos sem causar efeitos nocivos, contudo, também existem cepas com mecanismos de virulência que atribuem à essas bactérias patogenicidade⁽¹⁰⁾.

As cepas de *Escherichia coli* são as principais causadoras de infecções de trato urinário (ITU)⁽¹⁰⁻¹¹⁾, sendo que as ITU apresentam morbidade significativa e alto custo médico⁽¹⁰⁾. Além disso, podem causar infecções de sítio cirúrgico, diarreia, infecções abdominais e pancreáticas⁽¹²⁾.

O Imipenem e o Meropenem são antibióticos betalactâmicos pertencentes a classe dos carbapenêmicos⁽¹³⁾, são utilizados no tratamento de infecções por cepas multirresistentes de *Escherichia coli*, sua administração é realizada por via parenteral e tipicamente ocorre concomitantemente com a administração de

outros antibióticos. O uso desses fármacos é restrito, objetivando evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana.

O que nos motivou para a realização deste estudo foi a expectativa de que o efeito *in vitro* da associação do *Allium sativum* com os antibióticos Imipenem ou Meropenem potencialize a ação dos antibióticos, demonstrando sinergismo entre os mesmos. Caso o mesmo sinergismo fosse constatado em estudos subseqüentes *in vivo*, haveria possibilidade de avanços no tratamento de infecções por cepas multirresistentes de *Escherichia coli*, traduzindo-se em benefícios clínicos e terapêuticos como a redução do tempo de tratamento das infecções, da dose de antibiótico necessária para terapia, a dos efeitos adversos causados pelos antibióticos e do custo de tratamento.

Objetivo

Avaliar a susceptibilidade *in vitro* entre o extrato bruto de *Allium sativum* L. (alho) e antibióticos carbapenêmicos (Imipenem e Meropenem) frente às cepas de *Escherichia coli* sensíveis aos antibióticos testados e os impactos da associação medicamentosa entre os antibióticos e o extrato bruto de *Allium sativum*.

Materiais e Métodos

Material Botânico

Os bulbos de alho foram adquiridos de fonte comercial e mantidos sob refrigeração (-20°C) no Departamento de Ciências Fisiológicas da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo até sua utilização. O material vegetal foi identificado e registrado no herbário sob o número (SP 502077) por Domingo Sávio Rodrigues, doutor em Agronomia, pesquisador do Instituto Botânico de São Paulo.

Os bulbos do *Allium sativum* (100g) foram maceados e filtrados, coletando-se a fase líquida, a qual foi denominada de extrato bruto (EB) utilizado nos testes biológicos.

Material Biológico

Utilizaram-se cepas de *Escherichia coli* armazenadas na bacterioteca do laboratório da Disciplina de Microbiologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, originárias do Laboratório Central do Hospital da Irmandade da Santa Casa de São Paulo.

Para procedimentos microbiológicos de cultura, utilizamos placas de ágar *Mueller-Hinton* de 150mm; discos *blank* (disco de papel simples), pó para caldo *Trypticase Soy Broth*, *swabs*, micropipeta de 1 µL a

10µL, discos com os antibióticos Imipenem (10mcg) e Meropenem (10mcg), adquiridos do laboratório DME – Diagnósticos Microbiológicos Especializados.

Os antimicrobianos escolhidos foram os carbapenêmicos (Imipenem e Meropenem), utilizados para o tratamento das infecções causadas por cepas de *E. coli* multiresistentes.

Para realização dos testes microbiológicos, adotaram-se as normas e condutas estabelecidas pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) e pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para Segurança e Controle de Qualidade no Laboratório de Microbiologia Clínica⁽¹⁴⁻¹⁵⁾. Para avaliação dos testes microbiológicos, empregaram-se as normas de desempenho estabelecidas pelo CLSI⁽¹⁶⁾, avaliando-se a presença ou ausência da resistência bacteriana ao antibiótico, através da mensuração dos halos de inibição após a semeadura das cepas nas placas com leitura do halo em mm após 48 horas de incubação em estufa a 37±2°C.

Os testes foram feitos em duplicata para garantir e confirmar os resultados.

Análise estatística

Para determinarmos o número de cepas de *Escherichia coli* necessárias para que se obtivesse nível de significância de 5% e um poder de teste de 80%, realizou-se uma simulação no programa PRIMER 3,01 com um estudo piloto utilizando 20 cepas. Os dados foram submetidos a testes *t-pareados* para determinar os números mínimos de cepa para cada antibiótico. Foi determinado então que utilizaríamos 97 cepas, garantindo realizar um número de culturas que superasse o número mínimo para os testes com Imipenem e Meropenem.

Empregaram-se como critérios de inclusão os intervalos de halo de inibição descritos pelo CLSI⁽¹⁶⁾, considerando-se como sensíveis as bactérias que apresentaram halos de inibição maiores ou iguais a 23

milímetros, frente ao Meropenem ou ao Imipenem; e como resistentes as que apresentaram halos de inibição menores ou iguais a 19 milímetros. Exclui-se qualquer cepa de *Escherichia coli* com halo de inibição menor do que o valor referido como sensível para a análise. Contemplou-se como espaço amostral para o Imipenem o total de 94 cepas e para o Meropenem 95 cepas.

Devido a distribuição da variável halo de inibição, optou-se por fazer a análise com testes não paramétricos (*Friedman e Wilcoxon*). Buscou-se inicialmente com o teste de *Friedman* avaliar a presença de diferença estatisticamente significativa entre os halos de inibição formados pela ação do extrato bruto do alho isolado (10µL de extrato bruto no disco *blank*), pela ação do disco de antibiótico isolado e pela ação da combinação do disco de antibiótico com o extrato bruto do alho (10µL de extrato bruto no disco antibiótico).

Em caso de diferença estatisticamente significativa pelo teste de *Friedman*, realizou-se o teste de *Wilcoxon*, comparando os desempenhos das substâncias antimicrobianas aos pares (por exemplo: Imipenem vs Imipenem + Extrato Bruto de Alho) e determinar qual Grupo teve o melhor resultado, constatando-se assim se houve diferença estatisticamente significativa entre os Grupos comparados.

Em todos os testes, foi adotado nível de significância de 5%.

Resultados

Com relação ao desempenho das substâncias testadas observou-se que a associação dos antibióticos com o EBA foi mais eficiente na inibição do crescimento das cepas de *E. coli*, dado que os intervalos de confiança 95% estão dentro de faixas acima das apresentadas pelas outras substâncias (Tabela 1).

Ademais, nas comparações par a par dos desempenhos das substâncias pelo teste de *Wilcoxon* constatou-se que as associações dos antibióticos ao EBA de fato apresentaram desempenho superior com

Tabela 1

Halo de inibição (mm) – discos de Meropenem e Imipenem isolados, das combinações dos antibióticos com 10 µL de extrato bruto de *Allium sativum* (EB), de 10 µL de extrato bruto de *Allium sativum* (EB) frente às cepas de *Escherichia coli*

Disco	Mediana	Limites do Intervalo de Confiança 95%	
		Inferior	Superior
Meropenem (n=95)	30	28,63	30,18
Meropenem com EB (n=95)	32	30,79	31,73
EB (n=95)	20	19,33	20,62
Imipenem (n=94)	28	27,78	28,66
Imipenem com EB (n=94)	30	29,12	29,96
EB (n=94)	20	29,12	29,96

Tabela 2

Comparação par a par da eficiência (halo de inibição) das substâncias - 10 µL de Extrato Bruto de *Allium sativum* isolado (EB), Disco de Antibiótico isolado e combinação do Disco de Antibiótico com 10 µL Extrato Bruto de *Allium sativum* (Antibiótico + EB) - frente aos Grupos de cepas de *Escherichia coli* Sensíveis aos antibióticos testados.

Comparações de Desempenho (halo)	p	Melhor Desempenho
Meropenem + EB vs Meropenem (n=95)	$p < 0,05$	Meropenem + EB
EB vs Meropenem + EB (n=95)	$p < 0,05$	Meropenem + EB
EB vs Meropenem (n=95)	$p < 0,05$	EB
Imipenem + EB vs Imipenem (n=94)	$p < 0,05$	Imipenem + EB
EB vs Imipenem + EB (n=94)	$p < 0,05$	Imipenem + EB
EB vs Imipenem (n=94)	$p < 0,05$	Imipenem

* Teste de Wilcoxon

diferença estatisticamente significativa com relação aos desempenhos do antibiótico isoladamente e ao do EB isoladamente, tanto com relação ao imipenem, quanto ao meropenem (Tabela 2).

Discussão

Estimulados pelas informações da medicina tradicional e da literatura científica sobre o efeito antimicrobiano do *Allium sativum* ^(4-9, 17-20), o presente estudo visou avaliar o efeito sobre cepas de *Escherichia coli* do extrato bruto do *Allium sativum* e o efeito da associação medicamentosa deste extrato com os antibióticos Meropenem e Imipenem, pertencentes à classe dos antibióticos carbapenêmicos, empregados no tratamento de infecções por cepas multirresistentes de *E. coli*.

Embora estudos anteriores demonstrem o potencial antimicrobiano do alho sobre cepas de *E. coli* ^(5,7-9,17-20), diferentemente de nosso estudo, nenhum deles fez uso do produto da maceração dos bulbos frescos do alho, o qual após filtração foi empregado, imediatamente, para avaliação da atividade biológica *in vitro*. Métodos de extração distintos podem determinar respostas biológicas distintas o que determina que a validação do efeito antimicrobiano preceda a investigação de possíveis associações medicamentosas.

Escolhemos utilizar os antibióticos Imipenem e Meropenem em nosso estudo, que são betalactâmicos pertencentes a classe dos carbapenêmicos ⁽¹³⁾. São empregados no tratamento de infecções por cepas multirresistentes de *Escherichia coli*, por vezes administrados concomitantemente com a administração de outros antibióticos. O uso desses fármacos é restrito, objetivando evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana. Tal escolha decorreu do fato de não termos encontrado estudos que avaliassem a associação desses antibióticos com o *Allium sativum* e da perspectiva de encontrar modos de potencializar a ação desses antibióticos, auxiliando no tratamento

das infecções por patógenos multirresistentes. Alguns possíveis benefícios resultantes da ação sinérgica dos antimicrobianos com o *Allium sativum* são as reduções do tempo de tratamento, do tempo de internação dos pacientes e do custo do tratamento.

A partir da análise dos nossos resultados foi possível demonstrar a ação antimicrobiana *in vitro* do extrato bruto de *Allium sativum* sobre cepas de *E. coli*. Além disto, foi possível evidenciar que a associação do extrato bruto com Imipenem e Meropenem potencializou as ações *in vitro* antimicrobianas destes antibióticos.

Surgem assim novas opções de pesquisa *in vivo* para o desenvolvimento de estudos translacionais dado que essa associação medicamentosa em humanos pode-se provar benéfica na terapia de infecções por *Escherichia coli*.

Conclusão

Na avaliação *in vitro* dos desempenhos do Extrato Bruto de *Allium sativum* (EB) isolado, dos discos de antibióticos isolados (Meropenem e Imipenem) e da combinação de EB com esses discos de antibióticos frente às cepas de *Escherichia coli* sensíveis aos antibióticos testados, constatou-se que:

- O extrato bruto de *Allium sativum* demonstrou efeito antimicrobiano frente às cepas de *E. coli* sensíveis aos antibióticos testados.
- Em todos os grupos de cepas de *E. coli* sensíveis aos antibióticos testados, Imipenem e Meropenem, constatou-se que as combinações de EB com os discos de antibióticos apresentaram melhor desempenho, demonstrando sinergismo, com potencialização efeito antimicrobiano resultante.

Referências

1. Mathur P, Singh S. Multidrug resistance in bacteria: a serious patient safety challenge for India. J Lab Physicians. 2013; 5(1):5-10.

2. Fair RJ, Tor Y. Antibiotics and bacterial resistance in the 21st century. *Perspect Medicin Chem*. 2014; 6:25-64.
3. Furuya EY, Lowy FD. Antimicrobial-resistant bacteria in the community setting. *Nat Rev Microbiol*. 2006; 4(1):36-45.
4. Badke MR, Budo MLD, Silva FM, Ressel LB. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. *Esc Anna Nery Rev Enferm*. 2011;15(1):132-9.
5. Majewski M. *Allium sativum*: facts and myths regarding human health. *Rocz Panstw Zakl Hig*. 2014; 65(1):1-8.
6. Abdul Qadir M, Shahzadi SK, Bashir A, Munir A, Shahzad S. Evaluation of phenolic compounds and antioxidant and antimicrobial activities of some common herbs. *Int J Anal Chem*. 2017; 2017:3475738.
7. Iwalokun BA, Ogunledun A, Ogbolu DO, Bamiro SB, Jimi-Omojola J. In vitro antimicrobial properties of aqueous garlic extract against multidrug-resistant bacteria and *Candida* species from Nigeria. *J Med Food*. 2004; 7(3):327-33.
8. Sohn DW, Han CH, Jung YS, Kim SI, Kim SW, Cho YH. 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*. 2009; 34(3):215-9.
9. Ushimaru PI, Barbosa LN, Fernandes AA, Di Stasi LC, Fernandes A Jr. In vitro antibacterial activity of medicinal plant extracts against *Escherichia coli* strains from human clinical specimens and interactions with antimicrobial drugs. *Nat Prod Res*. 2012; 26(16):1553-7.
10. Ejrnæs K. Bacterial characteristics of importance for recurrent urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Dan Med Bull*. 2011;58(4):B4187.
11. Lim JY, Yoon J, Hovde CJ. A brief overview of *Escherichia coli* O157:H7 and its plasmid O157. *J Microbiol Biotechnol*. 2010; 20(1):5-14.
12. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Microbiologia clínica para o controle de infecção relacionada à assistência à saúde. Módulo 3: Principais Síndromes Infeciosas. Brasília (DF): ANVISA; 2013. 150p.
13. Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Fármacos antibacterianos. In: Rang HP, Ritter JM, Flower RJ, Henderson G. Rang & Dale farmacologia. 8ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016. p.632-3.
14. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Protection of Laboratory Workers From Occupationally Acquired Infections; Approved Guideline—Third Edition. CLSI document M29-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2016.
15. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Manual de microbiologia clínica para o controle de infecção em serviços de saúde. Módulo II: Segurança e Controle de Qualidade no Laboratório de Microbiologia Clínica. Brasília: ANVISA; 2013.
16. Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing. 27th ed. CLSI supplement M100. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2017.
17. Maldonado PD, Cháñez-Cárdenas ME, Pedraza-Chaverri J. Aged garlic extract, garlic powder extract, S-allylcysteine, diallyl sulfide and diallyl disulfide do not interfere with the antibiotic activity of gentamicin. *Phytother Res*. 2005;19(3):252-4.
18. Bag A, Chattopadhyay RR. Evaluation of synergistic antibacterial and antioxidant efficacy of essential oils of spices and herbs in combination. *PLoS One*. 2015;10(7):e0131321.
19. Sanad RA, Mabrouk MI. Development and assessment of stable formulations containing two herbal antimicrobials: *Allium sativum* L. and *Eruca sativa* miller seed oils. *Drug Dev Ind Pharm*. 2016;42(6):958-68.
20. Idris AR, Afegbua SL. Single and joint antibacterial activity of aqueous garlic extract and Manuka honey on extended-spectrum beta-lactamase-producing *Escherichia coli*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2017;111(10):472-8.

Trabalho recebido: 27/02/2019

Trabalho aprovado: 11/11/2019

Trabalho publicado: 12/11/2019