

Foram feitas testemunhas adequadas do meio e da concentração alcoólica máxima : 10 e 5% na primeira série de experiências, e 5% na segunda.

As culturas foram sempre incubadas a 37° C.

RESULTADOS

Na primeira série de experiências todas as amostras de brucelas foram completamente inibidas nas concentrações de 0.2 — 0.1 — 0.05 e 0.03 UG/ml. Na concentração de 0.02 UG/ml nasceram, com muita dificuldade, 3 amostras (2 *abortus* e 1 *suis*), em raras colônias, e no fim de 5 dias. Na concentração de 0.01 UG/ml nasceram, em algumas colônias, 7 amostras (3 *abortus*, 3 *suis* e 1 *melitensis*), em prazos que variaram de 2 a 4 dias. Não cresceram durante todo o prazo de observação, em nenhuma das concentrações, 3 amostras (2 *abortus* e 1 *suis*). No meio puro, todas as amostras nasceram no primeiro dia, excepto uma de *Br. abortus*, que nasceu no segundo dia. No meio com 10% de álcool etílico, nenhuma das amostras nasceu em 10 dias. No meio com 5% de álcool etílico, todas as amostras nasceram entre 2 e 6 dias.

Na segunda série de experiências verificamos que as amostras semeadas em meio líquido nasciam, dum modo geral, mais rapidamente do que em meios sólidos. Todas as amostras, em ambos os tipos de meio, foram completamente inibidas na concentração de 0.1 UG/ml, durante os 11 dias de observação. O efeito da droga sobre as brucelas não foi somente bacterioimpediente, mas também bactericida, pelo menos em meio líquido, visto como os conteúdos de 25 tubos, escolhidos ao acaso, desses 35 utilizados na prova, depois de 12 dias de incubação, foram despejados sobre placas de agar triptose e, em nenhuma destas, foi observado desenvolvimento algum de brucelas durante 6 dias de incubação a 37° C.

Os resultados obtidos em caldo triptose foram os seguintes:

Na concentração de 0.05 UG/ml, 22 amostras (13 *abortus*, 5 *suis* e 4 *melitensis*) nasceram em prazos variáveis de 3 a 9 dias. Nas concentrações de 0.03 e 0.025 UG/ml, somente uma amostra de *Br. abortus* não cresceu; as outras todas nasceram entre o segundo e o quinto dias, excepto uma de *Br. suis* que nasceu, respectivamente, com 11 e 6 dias. No meio puro, todas as amostras nasceram no primeiro dia. No meio com 5% de álcool etílico, todas nasceram entre 3 e 11 dias, excepto uma de *Br. abortus* que não nasceu durante todo o prazo da experiência.

Em agar triptose, nessa segunda série de experiências, a inibição do desenvolvimento foi observada mais intensamente do que em meio líquido,

com menores concentrações do antibiótico. Na concentração de 0.05 UG/ml, nasceram apenas 8 amostras (6 *abortus*, 1 *suis* e 1 *melitensis*); raras colônias apareciam entre 7 e 9 dias. Na concentração de 0.03 UG/ml nasceram 29 amostras (17 *abortus*, 8 *suis* e 4 *melitensis*), em prazos variáveis de 3 a 11 dias, em geral 4 a 8. Na concentração de 0.025 UG/ml, apenas 4 amostras não cresceram (3 *abortus* e 1 *suis*); as outras nasceram entre 3 e 8 dias, em geral 3 a 5. No meio puro, todas as amostras nasceram entre 1 e 4 dias, enquanto que no meio com 5% de álcool etílico, todas nasceram entre 3 e 8 dias.

Os quadros 1, 2 e 3 resumem os resultados obtidos.

DISCUSSÃO

Desde 1918, Walker (14) verificara que existiam na cebola (*Allium cepa*), substâncias voláteis com efeitos inibidores sobre a germinação de esporos de *Colletotrichum circinans*, um fungo patogênico para esse vegetal. Durante 30 anos, Walker e colaboradores continuaram a estudar o assunto, expondo recentemente o estado atual da questão (5). Enquanto isso, outros pesquisadores estudavam a ação de substâncias inibidoras existentes não só na cebola como também no alho (*Allium sativum*). Walton & Cols. (15) verificaram que os vapores de alho eram bactericidas para o *Bacillus subtilis*, mas perdiam a atividade após fervura ou autoclavagem. Outras pesquisas feitas revelaram que tanto no alho quanto na cebola existiam substâncias voláteis bacterioimpedientes e bactericidas, que foram chamadas por alguns autores, inclusive russos, de *fitoncidas*, termo que se procurou generalizar a outros antibióticos derivados de vegetais superiores e que não tem encontrado maior aceitação, embora Waksman (13) o considere melhor, mesmo, do que "substância antibiótico-símile" ou "antibiótico de plantas".

Só recentemente, porém, em virtude do desenvolvimento tomado pelos estudos sobre antibióticos, é que foi dada maior importância às substâncias extraídas do alho, inicialmente com o isolamento da alicina, por Cavallito & Cols. e, mais recentemente, com o isolamento da garlicina, por Machado & Cols.

Em relação a esta última, é provável que a maior atividade (em relação ao peso) de algumas partidas corresponda à presença de maior quantidade de substâncias voláteis antibióticas, as quais se perderiam durante os processos de purificação, se bem que Machado (8) julgue haver polimerização, em vez de volatilização, durante o preparo.

Com a primeira amostra de garlicina que obtivemos (8 M 1), a atividade em relação ao peso era muito grande: 130 UG/mg (8), ou sejam, 0.13 UG/ γ . A segunda amostra recebida era menos ativa do que a primeira, cerca de 650 vezes: 0.2 UG/mg.

Nosso modo de pensar com relação à provável ação de substâncias voláteis existentes na garlicina, encontra apoio nas verificações de Bendz & Cols. (2), que isolaram de *Marasmius ramealis* um antibiótico parecendo composto de 2 substâncias: uma volátil e outra não volátil, de certa semelhança com a alicina de Cavallito & Cols.

Em nossas experiências, 10 amostras de brucelas foram completamente inibidas pela garlicina (amostra 8 M 1), na concentração de 0.03 UG/ml de meio; isso equivaleria, em peso, aproximadamente, a 0.25 γ /ml. Três dessas 10 amostras de brucelas foram completamente inibidas, na concentração de 0.01 UG/ml de meio, ou sejam, 0.075 γ /ml de meio, demonstrando a grande potência do antibiótico sobre essas bactérias.

Já na segunda série de experiências, a inibição total de 35 amostras de brucelas, em meios líquidos e sólidos, verificou-se na concentração de 0.1 UG/ml de meio, ou sejam, 500 γ /ml. Esta amostra de garlicina era altamente purificada. Depreende-se claramente que a purificação deve ter diminuído a atividade.

SUMÁRIO

Os autores verificaram, pelo método de diluição em placas de agar triptose e em caldo triptose, que a garlicina, antibiótico extraído do alho (*Allium sativum*), é bastante ativa sobre brucelas.

Em duas séries de experiências, 10 e 35 amostras de brucelas foram totalmente inibidas, nas concentrações de 0.03 UG/ml e 0.1 UG/ml de meio, respectivamente, utilizando-se duas amostras diferentes de garlicina.

Essas concentrações correspondiam, respectivamente, a 0.25 γ /ml e 500 γ /ml. A disparidade dos resultados deve-se ao fato de que a atividade da garlicina, em relação ao peso, varia de partida para partida.

Três amostras de brucelas foram totalmente inibidas em seu desenvolvimento com 0.01 UG/ml, ou sejam, aproximadamente, 0.075 γ /ml de meio.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos aos Drs. Amadeu Cury e Paulo de Almeida Machado, as amostras de garlicina que gentilmente nos forneceram.

QUADRO 1

Ação da garlicina (amostra 1), sobre brucelas, em agar triptose

Brucella	N.º DE AMOS-TRAS	"GARLICINA" UG/ml			TESTEMUNHAS		
		0.2 0.1 0.05 0.03	0.02	0.01	Meio puro	Meio + álcool etílico	
						10%	5%
<i>abortus</i>	5	0	2 em 5d. 3 não cr.	3 em 2-4d. 2 não cr.	4 em 1d. 1 em 2d.	0	5 em 2-6d.
<i>suis</i>	4	0	1 em 5d. 4 não cr.	3 em 2d. 1 não cr.	4 em 1d.	0	4 em 2-4d.
<i>melitensis</i>	1	0	0	1 em 3d.	1 em 1d.	0	1 em 5d.

0 = nenhum crescimento em 10 dias.
1 UG = 7.7 γ aproximadamente.

QUADRO 2

Ação da garlicina (amostra 2), sobre brucelas, em caldo triptose

Brucella	N.º DE AMOS-TRAS	"GARLICINA" UG/ml				TESTEMUNHAS	
		0.1	0.05	0.03	0.025	Meio puro	Meio + 5% de álcool etílico
<i>abortus</i>	21	0	13 em 4-9d. 8 não cr.	20 em 2-5d. 1 não cr.	20 em 2-4d. 1 não cr.	21 em 1 d.	20 em 4-11d. 1 não cr.
<i>suis</i>	10	0	5 em 4-9d. 5 não cr.	9 em 2-4d. 1 em 11d.	9 em 2-3d. 1 em 6d.	10 em 1d.	10 em 4-11d.
<i>melitensis</i>	4	0	4 em 3-6d.	4 em 2 d.	3 em 2d. 1 em 4d.	4 em 1d.	4 em 3-7d.

0 = nenhum crescimento em 11 d.
1 UG = 5 mg. = 5.000 γ

QUADRO 3

Ação de garlicina (amostra 2), sobre brucelas, em agar triptose

Brucella	N.º DE AMOS-TRAS	"GARLICINA" UG/ml				TESTEMUNHAS	
		0.1	0.05	0.03	0.025	Meio puro	Meio + 5% de álcool etílico
<i>abortus</i>	21	0	6 em 7-9d. 15 não cr.	17 em 3-10d. 4 não cr.	18 em 3-8d. 3 não cr.	21 em 2-4d.	21 em 4-8d.
<i>suis</i>	10	0	1 em 7d. 9 não cr.	8 em 4-9d. 2 não cr.	9 em 3-7d. 1 não cr.	10 em 1-3 d.	10 em 3-6d.
<i>melitensis</i>	4	0	1 em 7 d. 3 não cr.	4 em 4-11d	4 em 3-5d.	4 em 1-2d.	4 em 4d.

0 = nenhum crescimento em 11 dias.
1 UG = 5 mg = 5.000. γ

BIBLIOGRAFIA

1. BAROWSKY, H. & BOYD, L. J.
1944. Sobre o uso do alho (Allisatine) nas perturbações gastro-intestinais. Estudo clínico. — Trad. de Rev. of Gastroenterology, 11 (1) : 22-29.
2. BENDZ, G.; WALLMARK, G. & OBLOM, K.
1948. The antibiotic agent from *Marasmius ramealis* — Nature, 162 (4106) : 61-62.
3. CAVALLITO, C. J. & BAILEY, J. H.
1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I — Isolation, physical properties and antibacterial action — Jour. Am. Chem. Soc., 66 : 1950-1951.
4. CAVALLITO, C. J.; BUCK, J. S. & SUTER, E. M.
1944. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. II — Determination of the chemical structure — Jour. Am. Chem. Soc., 66 : 1952-1954.
5. HATFIELD, W. C.; WALKER, J. C. & OWEN, J. H.
1948. Antibiotic substances in onion in relation to disease resistance — Jour. Agric. Res., 77 (4) : 115-135.
6. LECLERC, H.
1948. Un traitement alliacé de la coqueluche — Presse Méd., 56 (15) : 189.
7. LUCAS, E. H.; PEARSON, K.; LEWIS, R. W. & VINCENT, B.
1948. Preparation of crude plant extracts and their assay for presence of antibacterial substances — Food Res., 13 (1) : 82-88.
8. MACHADO, P. A.
1948. Informação pessoal, em carta de 26-IV-48.
9. MACHADO, P. A.; DURÁN, M. G.; CROSS, J. & SANTOS, D. C.
1948. Garlicina — Um novo antibiótico — An Paul. Med. e Cir., 55 (2) : 93-115.
10. ÖZEK, ÖMER
1946. Sarimsagin bakteriler üzerrindeki etkisi hakkında (O efeito do alho sobre bactérias) — Istanbul Serir., 27 : 156-161. Res. em Biol. Abstr., 1947, 21 (10) : 2.477, n° 25.379.
11. RAO, R. R.; RAO, S. S. & VENKATARAMAN, P. R.
1946. Investigations on plant antibiotics. I — Studies on allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum* (garlic) — Jour. Sci. & Industr. Res., India, 5 (2) : 31-35. Res. em Biol. Abstr., 1948, 22 (1) : 133, n° 1.503.
12. SMALL, L. D.; BAILEY, J. H. & CAVALLITO, C. J.
1947. Alkyl thiolsulfinates — Jour. Am. Chem. Soc., 69 (7) : 1710-1713.
13. WAKSMAN, S. A.
1947. What is an antibiotic or an antibiotic substance? — Mycologia, 39 (5) : 565-569.
14. WALKER, J. C.
1918. Notes on the resistance of onions to anthracnose (Abstract) — Phytopathology, 8 (2) : 70-71.
15. WALTON, L.; HERBOLD, M. & LINDEGREN, C.C.
1936. Bactericidal effects of vapors from crushed garlic — Food Res., 1 : 163-169.