

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULATÓRIA DE EUGENOL

EVALUATION OF THE ANTIBACTERIAL AND MODULATORY ACTIVITY OF EUGENOL

DOI: <https://doi.org/10.16891/2317-434X.v11.e3.a2023.pp3073-3078> Recebido em: 05.02.2023 | Aceito em: 30.09.2023

Vanessa Lima Bezerra^a, Plínio Bezerra Palácio^a,
José Walber Gonçalves Castro^b,
Julio Cesar Silva^b, Daniely Sampaio^c

Centro Universitário Doutor Leão Sampaio – UNILEÃO^a
Universidade Regional do Cariri - URCA^b
Universidade Federal do Ceará - UFC^c
*E-mail: vanelima2@hotmail.com

RESUMO

O objetivo dessa pesquisa foi avaliar a atividade antibacteriana e modulatória do Eugenol frente as linhagens padrões e multirresistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Essa atividade foi testada através de disco difusão, onde foi preparado um inóculo de $0,5 \times 10^8$ UFC/mL das cepas selecionadas em Caldo de Infusão Cérebro e Coração (BHI), transferindo 500µl para solução salina e com um swab semeando em tapete no ágar Müeller-Hinton (MH). Discos estéreis de papel filtro impregnados com 10 µL de Eugenol puro e em cinco diluições diferentes em água estéril, foram colocados na superfície do meio. Discos impregnados com água, controle negativo, e discos contendo o antibiótico Amicacina, controle positivo, foram colocados no ágar e as placas incubadas em estufa a 37°C por 24h. O halo de inibição foi medido utilizando uma régua. Foram utilizados ainda discos contendo Cloranfenicol 30µg e Sulfonamida 300µg, que em seguida foram embebidos com 10 µL de Eugenol e distribuídas no meio inoculado com a bactéria. Após incubação das placas a 37 °C por 24h, os halos de inibição foram mensurados e os resultados analisados estatisticamente. O Eugenol apresentou resultados de inibição bacteriana no produto puro em todos os espécimes testados (halos de média 6mm) e associado ao Cloranfenicol apresentou efeito sinérgico contra *Escherichia coli* 25922 ($p < 0,001$), efeito antagônico contra *E. coli* 27 ($p < 0,001$) e em ambas as cepas de *Staphylococcus aureus* uma relação antagonista ($p < 0,001$ e $p < 0,01$), já com Sulfonamida resultou em antagonismo nas duas cepas de *S. aureus* ($p < 0,05$ e $p < 0,001$) e na cepa *E. coli* 27 ($p < 0,001$), enquanto que na 25922 houve um aumento do halo de inibição estaticamente não significativa. Diante dos resultados destacou-se que o Eugenol é um agente antibacteriano, além de interferir de alguma maneira na ação de medicamentos já comercializados, assim vê-se a necessidade de estudar a interação dessa substância com outros antimicrobianos como uma alternativa no combate a resistência microbiana.

Palavras-chave: Disco-difusão. Plantas medicinais. Resistência bacteriana.

ABSTRACT

The objective of this research was to evaluate the bacterial and modulatory reaction capacity of the Eugenol molecule against the concentration and multiresistant patterns of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. This activity was tested using disc diffusion, where an inoculum of 0.5×10^8 CFU/mL of the selected strains was prepared in Brain and Heart Infusion Broth (BHI), transferring 500µl to saline solution and with a swab sown on mat on Müeller-Hinton agar (MH). Sterile filter paper discs impregnated with 10 µL of pure Eugenol and in five different dilutions in sterile water were placed on the surface of the agar. Discs impregnated with water, negative control, and disks containing the antibiotic Amikacin, positive control, were placed on agar and the plates incubated in an oven at 37°C for 24h. The halo of inhibition was measured using a ruler. Discs containing Chloramphenicol 30µg and Sulfonamide 300 µg were also used, which were then soaked with 10 µL of Eugenol and distributed in the medium inoculated with the bacteria. After incubating the plates at 37 °C for 24 hours, the inhibition halos were measured and the results statistically analyzed. Eugenol showed bacterial inhibition results in the pure product in all specimens tested (average 6mm halos) and associated with Chloramphenicol, it showed a synergistic effect against *Escherichia coli* 25922 ($p < 0,001$), antagonistic effect against *E. coli* 27 ($p < 0,001$) and in both strains of *Staphylococcus aureus* there was an antagonistic relationship ($p < 0,001$ e $p < 0,01$), and with Sulfonamide resulted in antagonism in the two strains of *S. aureus* ($p < 0,05$ e $p < 0,001$) and in strain *E. coli* 27 ($p < 0,001$), while in strain 25922 there was a statically non-significant increase in the stretch halo. In view of the results, it was highlighted that Eugenol is an antibacterial agent, in addition to interfering in some way in the action of drugs already marketed, so there is a need to study the interaction of this substance with other antimicrobials as an alternative in the fight against microbial resistance.

Keywords: Disc-difusion. Medicinal plants. Bacterial resistance.

INTRODUÇÃO

As fontes de resistência microbiana são inúmeras, mas a fonte mais estabelecida é a relação entre o uso indiscriminado de antibióticos e o surgimento de patógenos resistentes a esses antimicrobianos (MONTEIRO et al., 2020). Estimativas sugerem que cerca de metade de todo o consumo de antibióticos pode ser evitado, mas em muitos locais esses são comprados sem receita médica ou aconselhamento de um profissional da saúde (WHO, 2005).

As pesquisas em busca de obter mais conhecimento nas diversas áreas da ciência aumentam a cada dia e assim vem oferecendo infinitas possibilidades tecnológicas de tratar todas as formas de doenças, entretanto, nem sempre essas possibilidades são aproveitadas para melhorar o acesso das populações aos medicamentos que continuam com preços exorbitantes e incompatíveis com os orçamentos de saúde dos países, principalmente aqueles em desenvolvimento (HASENCLEVER et al., 2017).

Uma vez que a produção de novos agentes antimicrobianos está em míngua, necessita-se da implementação de estratégias destinadas a preservar a integridade e a eficácia do arsenal antimicrobiano existente (SILVA; NUNAM; ROCHA, 2019). Assim faz-se necessário uma série de estudos com plantas medicinais e compostos obtidos destas, principalmente para a identificação de espécies com ação farmacológica comprovada e/ou substâncias biologicamente ativas (FERNANDES et al., 2019).

Um exemplo disso é o Eugenol, composto fenólico volátil, principal constituinte do óleo essencial de cravo-da-índia. Essa substância é utilizada para produzir vanilina e é amplamente utilizado em perfumaria, como aromatizante de alimentos e cigarros e como anestésico, principalmente na psicultura (SINGH; MUKHOPADHYAY; SACHAN, 2019; OLAS, 2021; OLIVEIRA; ARRUDA, 2021; SANTOS et al., 2022).

Popularmente produtos naturais derivados de plantas são amplamente utilizados para tratar doenças, mas sem nenhuma comprovação de sua eficácia e segurança. Devido essa prática empírica, inúmeros estudos vêm sendo realizados nesse sentido com o propósito de entender a composição e possível ação de compostos derivados dessas plantas no combate a doenças, assim como expor uma ação potencializadora dos antimicrobianos disponíveis a fim de ser útil no combate a resistência. Diante disso o objetivo dessa pesquisa foi

avaliar a atividade antibacteriana e modulatória da substância Eugenol frente a linhagens padrão e multirresistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo experimental, de caráter quantitativo. Foram utilizadas as linhagens bacterianas padrão de *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 cedidas pelo Instituto Oswaldo Cruz e as linhagens multirresistentes de isolados clínicos *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358. Todas as linhagens foram mantidas em Caldo de Infusão Cérebro e Coração (BHI).

Para os testes de disco difusão inicialmente foi preparado um inóculo de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL das cepas selecionadas em Caldo de Infusão Cérebro e Coração (BHI) (GARCIA; UEDA; MIMICA, 2011). Em um tubo contendo 5ml de solução salina foram acrescentados 500 μ L da suspensão bacteriana e com um swab estéril, o inóculo bacteriano foi espalhado uniformemente sobre a superfície do ágar Müller-Hinton (MH) em semeadura de tapete, selando para que o inóculo recobrisse completamente o meio (SILVEIRA et al., 2009).

Utilizando-se uma pinça estéril, os discos estéreis de papel filtro impregnados com 10 μ L de Eugenol puro e em cinco diluições diferentes (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16), obtidas através da diluição em água estéril, foram colocados na superfície da placa (SILVEIRA et al., 2009). Discos impregnados com água, controle negativo e discos contendo o antibiótico Amicacina, controle positivo, foram colocados no ágar e as placas incubadas em estufa a 37°C por 24h. O halo de inibição do crescimento foi medido utilizando uma régua milimetrada (GARCIA; UEDA; MIMICA, 2011; SILVEIRA et al., 2009).

Foram utilizados ainda discos contendo Cloranfenicol 30 μ g e Sulfonamida 300 μ g, que em seguida foram embebidos com 10 μ L da concentração subinibitória (CIM/8) de Eugenol e, após isso, distribuídas no ágar Muller-Hinton inoculado com as suspensões bacterianas. Após incubação das placas a 37 °C por 24h os halos de inibição foram mensurados e os resultados analisados estatisticamente, comparando-os com os controles de antibióticos (CANTON; ONOFRE, 2010). Através desta metodologia, os halos de inibição dos antibióticos isolados e dos antibióticos associados a substância foram comparados para verificar se houve algum tipo de interação.

Os resultados foram expressos em média aritmética e desvio padrão, avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA), seguido pelo post-test Bonferroni utilizando o software GraphPad Prism, onde as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nos testes de disco difusão para atividade antibacteriana do Eugenol houve a formação de discretos halos de inibição, de em média 6mm de diâmetro, tanto nas cepas padrão como nas cepas multirresistentes de *S. aureus* e de *E. coli* testadas com a utilização do produto puro. Contudo não houve inibição do crescimento ou formação de halo em qualquer espécie estudada em nenhuma das diluições testadas (1:1, 1:2, 1:4, 1:8 e 1:16).

Do mesmo modo, o estudo de Chesca et al. (2017) apresentou atividade antibacteriana de óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*, composto principalmente por Eugenol, através da metodologia de disco difusão. O mesmo ocorreu com o óleo de *Pimenta dioica* testado por Gomes et al. (2020) frente a linhagens de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Serratia odorifera*.

A pesquisa realizada por Das et al. (2016) estudou o mecanismo de ação do Eugenol contra vários isolados clínicos de *S. aureus* e isolados resistentes à vancomicina, demonstrando que essa substância isolada foi capaz de

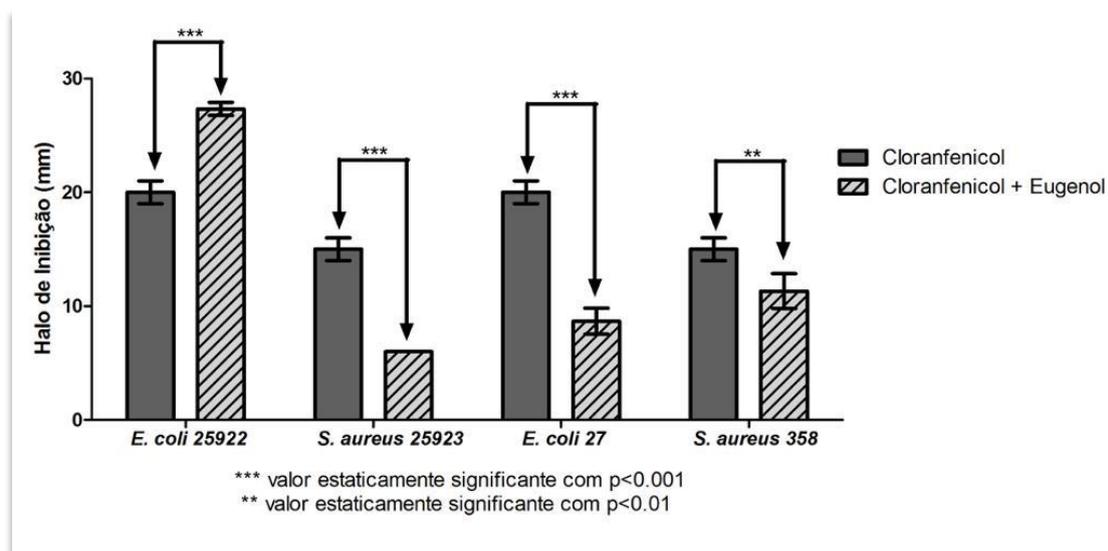
desencadear citotoxicidade na célula bacteriana devido à produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) o que induz a inibição do crescimento celular, ruptura da membrana celular e dano ao DNA, resultando em decomposição celular.

Estudos avaliando a atividade do Eugenol contra isolados de *S. aureus* resistentes a Meticilina (MRSA) e de *S. aureus* sensíveis a Meticilina (MSSA), demonstraram inibição equivalente do crescimento bacteriano dessas cepas, ao mesmo tempo que uma inibição na formação de biofilme foi evidenciada, tanto em MSSA quanto em MRSA, de uma maneira concentração dependente (YADAV et al., 2015).

Um composto natural extraído de plantas pode facilitar a entrada do antibiótico através de camadas externas da parede celular bacteriana, causar a perda de efeitos inibitórios de proteção, dentre outros ações potencializadoras (SIQUEIRA, 2018). Concomitante a atividade antibacteriana do composto, os resultados dos testes modulatórios apresentaram alguns resultados significantes de sinergismo e antagonismo.

O Eugenol ao ser associado ao antibiótico Cloranfenicol proporcionou um efeito potencializador sinérgico contra a bactéria *Escherichia coli* 25922, enquanto que na cepa multirresistente *E. coli* 27 o efeito foi de antagonismo significativo. Em ambas as cepas de *Staphylococcus aureus* houve uma relação antagonista entre o produto e o antibiótico, como pode ser visto no Gráfico 1.

Gráfico 1. Atividade modulatória de Cloranfenicol



Fonte: Dados da pesquisa

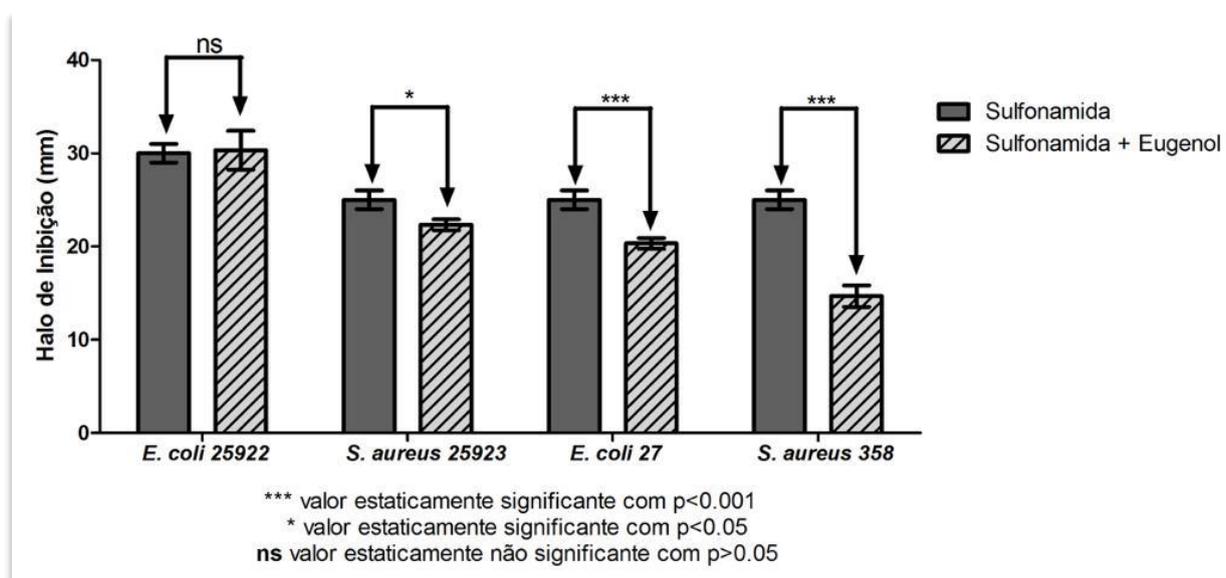
Em 2015, o estudo realizado por Liu et al. evidenciou atividade sinérgica entre Eugenol e Estreptomicina contra cepas de *Listeria monocytogenes* e *Salmonella typhimurium* planctônicas e associados a biofilme. O antibiótico Estreptomicina agiu sinergicamente com Eugenol contra *S. typhimurium*, enquanto que apenas efeito aditivo foi observado contra *L. monocytogenes*.

Segundo Doble & Hemaiswarya (2009) e Pinto (2011) a sinergia que ocorre com Eugenol e antimicrobianos ocorre devido seu prejuízo à membrana bacteriana, desde baixas concentrações da substância. Esse efeito é mais visível em antibióticos hidrofílicos, como a vancomicina e os β -lactâmicos, aumentando sua

atividade antibacteriana contra cepas Gram-negativas ao serem associadas a esse composto, o que explica o resultado da associação com Cloranfenicol, que é um fármaco lipossolúvel (MADDISON; PAGE; CHURCH, 2010)

A associação do produto isolado com Sulfonamida resultou em efeitos de antagonismo nas cepas de *S. aureus* padrão e multirresistente. Se tratando da espécie *E. coli* 25922 houve um aumento do halo de inibição de forma não significativa, no entanto na cepa multirresistente dessa espécie houve efeito antagônico entre o Eugenol e o antibiótico, como pode ser visto no Gráfico 2.

Gráfico 2. Atividade modulatória de Sulfonamida



Fonte: Dados da pesquisa

Em estudo de Silva-Leandro et al. (2020) frente a *S. aureus* e *E. coli* o óleo essencial de *Ocimum gratissimum* L. não apresentou efeito significativo sobre a ação do antibiótico Amicacina pelo método de contato gasoso, ao passo que em associação com LEDs houve um efeito potencializador da ação do antimicrobiano, principalmente frente a cepa Gram-positiva. O maior efeito sinérgico no estudo em questão ocorreu na espécie *Escherichia coli*, bactéria Gram-negativa, e esse fenômeno pode ser explicado devido as diferenças químicas e estruturais encontradas entre sua parede celular e a da bactéria *Staphylococcus aureus*, Gram-positiva, possuindo assim diferentes sítios de ação para fármacos como a camada de lipopolissacarídeos (LPS) ou a

membrana externa, enquanto que a Gram-positiva possui maior camada de peptídeoglicano (AUER; WEIBEL, 2017).

Na maioria das cepas testadas a modulação apresentou efeito antagônico entre as substâncias associadas, efeito esse ocasionado possivelmente devido alguma interferência do Eugenol nos mecanismos de ação desses fármacos, impedindo a inibição bacteriana em seu potencial esperado. Outra hipótese que poderia explicar esse fenômeno é o fato da substância diluir o antimicrobiano ao ser combinada a ele, diminuindo assim sua concentração e consequentemente diminuindo seu efeito.

A ingestão de medicamentos juntamente com chás e análogos é costume comum em diversas localidades devido ao conhecimento empírico dos benefícios das plantas no combate a doenças, todavia, sem a informação do possível antagonismo entre essas substâncias, que pode ocorrer em virtude da possível interferência de compostos isolados de plantas na ação dos fármacos, provavelmente devido a quelação mútua, sendo importante a elucidação da interação desses produtos naturais com os fármacos já comercializados.

CONCLUSÃO

Os resultados obtidos nessa pesquisa demonstraram que Eugenol apresentou discreta atividade antibacteriana (halos de inibição de 6mm) contra todas as

cepas testadas quando utilizado sem diluição. Esse ainda apresentou sinergismo com Cloranfenicol sobre a cepa *E. coli* 25922 e antagonismo com ambos os antibióticos para as demais espécies usadas no estudo. A metodologia de disco-difusão é muito utilizada na rotina laboratorial para liberação de laudos de testes de sensibilidade a antimicrobianos, destacando a importância da utilização desse tipo de metodologia para a microbiologia clínica. A partir desses resultados vê-se resultados promissores no uso de substâncias isoladas de plantas como alternativas para a escassez de antimicrobianos, assim como a necessidade de estudar a interação dessa substância com outros antimicrobianos e frente a outras bactérias e sua possível toxicidade, para que possa vir futuramente contribuir no combate a resistência microbiana.

REFERÊNCIAS

AUER, G.K; WEIBEL, D.B. Bacterial Cell Mechanics. **Biochemistry**, v. 56, n. 29. 2017.

CANTON, M; ONOFRE, S.B. Interferência de Extratos da *Baccharis dracunculifolia* DC., Asteraceae, sobre a Atividade de Antibióticos Usados na Clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, n.3. 2010.

CHESCA, A.C. et al. Estudo Comparativo da Atividade Antibacteriana do Extrato de Cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.) Extraído por Via Etanólica e Metanólica. In: Encontro de Desenvolvimento de Processos Agroindustriais, 1.,2017, Uberaba. **Anais [...]**. Uberaba: UNIUBE, 2017.

DAS, B. et al. Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage - Associated Antibacterial Activity Against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Libertas Academica**, v.9, n.1. 2016.

FERNANDES, B.F. et al. Estudo Etnofarmacológico das Plantas Medicinais com Presença de Saponinas e Sua Importância Medicinal. **Revista da Saúde da AJES**, v.5, n.9. 2019.

GARCIA, C.S; UEDA, S.M.Y; MIMICA, L.M.J. Avaliação da Atividade Antibacteriana in vitro de Extratos Hidroetanólicos de Plantas sobre *Staphylococcus aureus* MRSA e MSSA. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v.70, n.4. 2011.

GOMES, P. R. B. et al. Composição química e atividade antibacteriana do óleo essencial dos frutos da *Pimenta dioica*. **Revista Colombiana de Ciências Químico-farmacêuticas**, v.49, n.3. 2020.

HASENCLEVER, L. et al. A Indústria de Fitoterápicos Brasileira: Desafios e Oportunidades. **Revista Ciência & Saúde Coletiva**, v.22, n.8. 2017.

HEMAISWARYA, S; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bactéria. **Phytomedicine**, v. 16, n. 11. 2009.

LIU, Q. et al. Synergy among Thymol, Eugenol, Berberine, Cinnamaldehyde and Streptomycin against Planktonic and Biofilm-Associated Food-Borne Pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v.60, n.1. 2015.

MADDISON, J. E.; PAGE, S. W.; CHURCH, D. B; (2010). **Farmacologia clínica em pequenos animais**. 2 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010.

MONTEIRO, R. F. S. et al. O uso indiscriminado de antimicrobianos para o desenvolvimento de micro-organismos resistentes. **Revista Eletrônica Acervo Saúde**, v.53, n.53. 2020.

OLAS, M.U.B. Biological Properties and Prospects for the Application of Eugenol—A Review. **International Journal of Molecular Sciences**, v.22, n. 3671. 2021.

OLIVEIRA, N. S; ARRUDA, E. L. In silico Studies on the anticancerigenic activities of Eugenol in the Indian Carnation (*Syzygium aromaticum*). **Research, Society and Development**, v.10, n.4. 2021.

SANTOS, P.O. et al. Use of Eugenol for anesthesia of *Oreochromis niloticus*. **Brazilian Journal of Development**, v.8, n.9, 2022.

SILVA, M.G; NUNAN, E.A; ROCHA, M.P. Estudo químico e de atividade antibacteriana de extratos e óleo essencial de Citrus x limonia. **Brazilian Journal of Health and Pharmacy**, v.1, n.4. 2019.

SILVA-LEANDRO, M.K.N. et al. Modulation of Antibiotic Resistance by The Essential Oil of *Ocimum gratissimum* L. in Association with Light-emitting Diodes (LED) Lights. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v.75, n.11-12. 2020.

SILVEIRA, L.M.S. et al. Metodologias de Atividade Antimicrobiana Aplicadas a Extratos de Plantas:

Comparação entre Duas Técnicas de Ágar Difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.2. 2009.

SINGH, A; MUKHOPADHYAY, K; SACHAN, S.G. Biotransformation of eugenol to vanillin by a novel strain *Bacillus safensis* SMS1003. **Biocatalysis and Biotransformation**, v.37, n.4 .2019.

SIQUEIRA, I.B. **Potencial Antibacteriano do Óleo Essencial de *Croton tetradenius* (Baill.) Frente a Bactérias Uropatógenas e Sinergismo com Antibióticos**. 2018. 40p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal de Sergipe. São Cristóvão. 2018.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Containing Antimicrobial Resistance**. Geneva. 2005.

YADAV, M.K. et al. Eugenol: A Phyto-Compound Effective against Methicillin-Resistant and Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* Clinical Strain Biofilms. **Public Library of Science**, v.10, n.3. 2015.