

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DO EUGENOL CONTRA FORMAS PLANCTÔNICAS DE ENTEROBACTÉRIAS ISOLADAS DE ALIMENTOS

Benise Ferreira da Silva¹; Antônio Mateus Gomes Pereira²; Marília Viana Albuquerque de Almeida³; Victor Alves Carneiro⁴; Renata Albuquerque Costa⁵

¹Discente do Programa de Mestrado em Biotecnologia, UNINTA; E-mail: benise.f.silva@hotmail.com;

²Discente do Programa de Doutorado em Biotecnologia, RENORBIO/UECE; E-mail: mathewsgomes20@gmail.com;

³Docente do curso de Farmácia, UNINTA; Email: mariliav1985@gmail.com;

⁴Docente do Programa de Mestrado em Biotecnologia, UNINTA; E-mail: viktorcearneiro@gmail.com;

⁵Docente do Programa de Mestrado em Biotecnologia, UNINTA; E-mail: renata.albuq@gmail.com.

Resumo: O eugenol é um composto majoritário de óleos essenciais e vem sendo apontado como alternativa no combate a bactérias, incluindo patógenos veiculados a alimentos. O objetivo da presente pesquisa foi avaliar o efeito antibacteriano do eugenol contra enterobactérias isoladas de pescado. Foram utilizadas nove estirpes (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae*) e a atividade antibacteriana foi avaliada pelo método de disco-difusão em ágar, microdiluição em caldo e plaqueamento em ágar para determinação da concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima. Avaliou-se também a interferência do eugenol na cinética de crescimento das estirpes através da curva de crescimento no período de 24 horas. A concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima variaram de 1.250 a 2.500 µg/mL. O eugenol interferiu na cinética de crescimento sendo observada diminuição na área sob a curva e redução da densidade óptica. Diante do exposto, ressalta-se o potencial do eugenol contra enterobactérias provenientes de alimentos.

Palavras-chave: Eugenol; *Enterobacteriaceae*; Composto antibacteriano.

INTRODUÇÃO E OBJETIVOS

As enterobactérias são bacilos Gram-negativos associados a casos de gastroenterite e infecções extraintestinais, podendo acometer o sistema urinário, trato respiratório inferior, sistema nervoso central, pele e tecido subcutâneo (LEE; LEE; CHOE, 2018; ASGARI et al., 2021). Algumas espécies de enterobactérias podem ser usadas como indicadores de contaminação de origem fecal estando relacionadas ao estado de higiene no processo de produção dos alimentos (MLADENOVIC et al., 2021).

Dentre as espécies de enterobactérias, a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Enterobacter cloacae* vem sendo associadas a infecções nosocomiais (DAVIN-REGLI; PAGÈS, 2015). Essas espécies já foram isoladas de amostras de alimento, incluindo pescado, além disso, já foi relatada farmacoresistência a beta-lactâmicos (ALMEIDA et al., 2017).

A fim de mitigar a problemática da emergência de bactérias resistentes a fármacos pesquisas sobre o potencial antibacteriano de produtos naturais vêm sendo realizadas. Nesse sentido, o eugenol, pertencente ao grupo dos fenóis, destaca-se como um composto majoritário de vários óleos essenciais e apresenta diversas atividade farmacológica, incluindo antimicrobiana (ULANOWSKA; OLAS, 2021).

Diante do exposto, a presente pesquisa teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do eugenol contra cepas de enterobactérias isoladas de pescado através dos

testes de disco-difusão, determinação da concentração inibitória mínima e bactericida mínima e avaliação da influência na cinética de crescimento bacteriano.

MATERIAL E MÉTODOS

MICROORGANISMOS E CONDIÇÕES DE CULTIVO

Foram utilizadas nove enterobactérias farmacorresistentes isoladas de camarão (*Litopenaeus vannamei*) obtidas no comércio varejista de Sobral, CE, Brasil, identificadas previamente por Almeida et al. (2017). As enterobactérias, *E. coli* (n=3), *K. pneumoniae* (n=3) e *E. cloacae* (n=3) pertenciam a bacterioteca do NUBEM (UNINTA) e estavam mantidas a -20°C em Caldo TSB (Non-Animal - Acumedia) com 20% de glicerol. As cepas foram ativadas em meio TSB (Non-Animal - Acumedia) com incubação a 37°C por 24 horas.

TESTE DISCO-DIFUSÃO

A atividade antibacteriana do eugenol (FARMOS) foi determinada pelo método de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton (MHA) (KASVI), de acordo com *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2015). Inicialmente as cepas foram ajustadas a $1,5 \times 10^8$ UFC/mL em solução salina a 0,85% conforme o padrão 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, com um *swab* estéril, as cepas foram inoculadas em placas contendo MHA (KASVI – Itália). Posteriormente, três discos brancos estéreis (LABORCLIN) de 6 mm de diâmetro e embebidos com 10 µL de eugenol puro foram dispostos na superfície do MHA. Após 24 horas de incubação a 37° C, o efeito antibacteriano foi avaliado medindo o diâmetro das zonas inibitórias (DZI) em milímetros, e os resultados expressos como médias de três determinações.

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM), CONCENTRAÇÃO BACTERICIDA MÍNIMA (CBM) E CURVA DE CRESCIMENTO BACTERIANO

A determinação da CIM foi realizada pela técnica de microdiluição seriada em placas de poliestireno de 96 poços de fundo chato estéreis, conforme descrito por CLSI (2015), em triplicata. Foi utilizado uma solução estoque de eugenol (FARMOS) na concentração de 10 mg/mL, sendo avaliada as concentrações de 2.500, 1.250, 625, 312, 156, 78 e 39 µg/mL. Foram utilizados os seguintes controles: turbidez (meio TSB + eugenol), negativo (meio TSB + 1×10^6 UFC/mL) e de contaminação (apenas meio TSB). As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C. Após o período de incubação, considerou-se a CIM a menor concentração do eugenol capaz de inibir visualmente o crescimento bacteriano.

Para determinação da CBM foram utilizadas as placas da CIM e retirados 10 µL dos conteúdos dos poços que não apresentaram crescimento bacteriano visível e, inoculados, em triplicata, em placas com meio MHA incubadas a 37°C por 24 horas. Passado esse período, a CBM foi considerada como a menor concentração do eugenol onde não se observou crescimento bacteriano nas placas de MHA.

Para avaliar a interferência do eugenol na curva de crescimento bacteriano, seguiu-se o método descrito por He et al. (2019) com modificações. A placa previamente montada para a CIM foi lida com auxílio do espectrofotômetro (SpectraMax®Paradigm® Multi-Mode Detection Platform) a 620nm, nos tempos 0, 4, 8, 12 e 24h. Para cada cepa (n=3), os resultados foram apresentados na forma de gráficos considerando a interferência das concentrações sub-CIM do eugenol (1/2 e 1/4 CIM) e analisando estatisticamente (ANOVA)

a área sob a curva, utilizando o Bonferroni pós-teste. Como controle negativo foi considerada a leitura dos poços contendo o meio de TSB e a cepa bacteriana com concentração ajustada a 1×10^6 UFC/mL.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todas as cepas testadas apresentaram sensibilidade ao eugenol. Os resultados da atividade antibacteriana *in vitro*, como o diâmetro da zona de inibição, CIM, CBM, do eugenol contra as estirpes isoladas de alimentos estão detalhados na tabela 2.

Tabela 2 – Atividade antibacteriana do eugenol contra enterobactérias isoladas de alimentos.

Espécie	Código	DZI (mm) ¹	CIM ($\mu\text{g/mL}$) ²	CBM ($\mu\text{g/mL}$) ³
<i>Escherichia coli</i>	C22	15,3 \pm 0,5	2500	2500
	C27	16,6 \pm 1,1	2500	>2500
	C55	24,0 \pm 1,7	2500	2500
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	C17	20,3 \pm 0,5	2500	2500
	C21	16,3 \pm 1,5	1250	1250
	C28	16,0 \pm 0,1	2500	2500
<i>Enterobacter cloacae</i>	C32	18,0 \pm 0,1	1250	1250
	C35	15,0 \pm 0,1	2500	2500
	C47	21,3 \pm 0,5	2500	>2500

Fonte: Autoria própria (2022). ¹Diâmetro da Zona de Inibição; ²Concentração Inibitória Mínima; ³Concentração bactericida mínima.

Os halos de inibição variaram de 15,0 \pm 0,1, a 24,0 \pm 1,7. Dentre os nove isolados, a *E. coli* (C55) apresentou maior sensibilidade ao eugenol quando comparada com as demais. Esse ensaio serviu como triagem inicial para os experimentos posteriores.

A CIM e CBM do eugenol para todas as *E. coli* foi de 2.500 $\mu\text{g/mL}$, com exceção da C27, uma vez que não foi possível determinar a CBM, sendo superior a 2.500 $\mu\text{g/mL}$. As CIM e CBM do eugenol para as *K. pneumoniae* C17 e C28 foram 2.500 $\mu\text{g/mL}$, enquanto que para a *K. pneumoniae* C21 a CIM e CBM foi de 1.250 $\mu\text{g/mL}$. Já para as cepas de *E. cloacae*, o eugenol apresentou CIM e CBM de 1.250 para C32, CIM e CBM de 2.500 para C35 e CIM de 2.500 para C47. Não foi possível determinar a CBM da C47, sugerindo que seja superior a 2.500 $\mu\text{g/mL}$.

A ação do eugenol contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas é bem documentada na literatura (YADAV et al., 2015; QIAN et al., 2020). Qian e colaboradores (2020) avaliaram a ação do eugenol contra enterobactérias *K. pneumoniae* resistentes a carbapenem (KPRC) e apontaram CIM de 200 $\mu\text{g/mL}$. Na presente pesquisa os valores de CIM foram no mínimo seis vezes maior do que o reportado pelos autores supracitados, dessa forma, ressalta-se que cepas bacterianas da mesma espécie não necessariamente apresentam o mesmo perfil de sensibilidade ao eugenol. O estudo realizado por Dehkordi et al. (2019),

utilizando eugenol reportou CIM e CBM de 2.500 µg/mL contra *Salmonella Typhimurium*, corroborando os valores encontrados no presente estudo (Tabela 2).

Na presente pesquisa, o efeito antibacteriano do eugenol também foi observado na cinética de crescimento das enterobactérias em concentrações Sub-CIM (1/2 CIM e 1/4 CIM) (Figura 1).

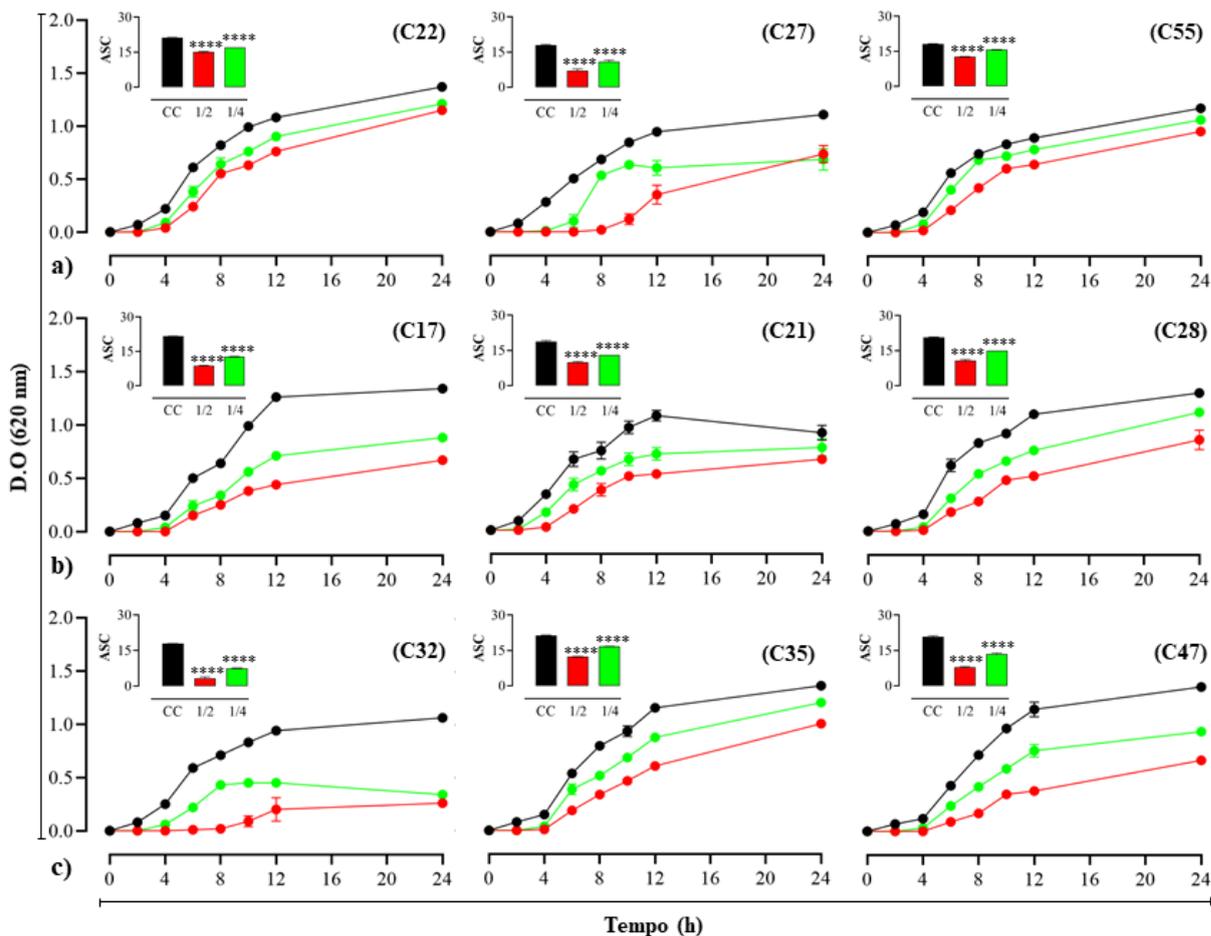


Figura 1 - Interferência do eugenol em concentrações sub-CIM (1/2 CIM (●), 1/4 CIM (●)) no crescimento bacteriano de estirpes de (a) *E. coli*, (b) *K. pneumoniae* e (c) *E. cloacae*.

ASC = Área sob a curva; controle (●); * $p < 0,05$. Fonte: Autoria própria (2022).

O eugenol nas concentrações 1/2 e 1/4 CIM interferiu na cinética de crescimento de todas as cepas, sendo a C27 e C32 as mais sensíveis quando comparada com as demais, uma vez que a fase lag foi estendida até 8h e observou-se também a redução da D.O após as 24h de incubação, sugerindo que houve uma redução de células quando comparadas com o grupo controle. Para as demais estirpes, a fase lag foi retardada até as 4h de incubação, nas duas concentrações testadas, observando-se também que a D.O reduziu após incubação por 24 h. Quando se observa a ASC, todas as cepas testadas apresentaram diferença estatística quando em contato com o eugenol em concentrações de 1/2 CIM e 1/4 CIM, indicando que houve redução da população bacteriana em todas as fases de crescimento.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O eugenol apresenta potencial contra formas plântônicas de enterobactérias

farmacorresistentes isoladas de alimento, uma vez que observou-se ação bactericida e interferência na cinética de crescimento bacteriano. Considerando o exposto, sugere-se a realização de pesquisas sobre a curva do tempo de morte e mecanismo de ação, além disso, o eugenol pode ser pesquisado como possível alternativa como adjuvante no controle de infecções bacterianas.

AGRADECIMENTOS

Centro Universitário INTA (UNINTA), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes).

REFERÊNCIAS (Até um máximo de 15)

ALMEIDA, Marília Viana Albuquerque de et al. Drug resistance, AmpC- β -lactamase and extended-spectrum β -lactamase-producing *Enterobacteriaceae* isolated from fish and shrimp. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 59, 2017.

ASGARI, Fatemeh et al. The long pentraxin PTX3 controls *Klebsiella pneumoniae* severe infection. **Frontiers in immunology**, v. 12, p. 666198, 2021.

CLSI. Clinical and Laboratory Standards Institute. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Fifteenth Information Supplement document M100-S15 (ISBN 1-56238-556-9). Pennsylvania, USA, 2015.

DAVIN-REGLI, Anne; PAGÈS, Jean-Marie. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. **Frontiers in microbiology**, v. 6, p. 392, 2015.

DEHKORDI, Negin Heydarian et al. Antibacterial interactions of colloid nanosilver with eugenol and food ingredients. **Journal of food protection**, v. 82, n. 10, p. 1783-1792, 2019.

HE, Tian-Fu et al. Cinnamaldehyde inhibit *Escherichia coli* associated with membrane disruption and oxidative damage. **Archives of microbiology**, v. 201, n. 4, p. 451-458, 2019.

LEE, Dong Sup; LEE, Seung-Ju; CHOE, Hyun-Sop. Community-acquired urinary tract infection by *Escherichia coli* in the era of antibiotic resistance. **BioMed research international**, v. 2018, 2018.

LEE, S.-Y.; JIN, H.-H. Inhibitory activity of natural antimicrobial compounds alone or in combination with nisin against *Enterobacter sakazakii*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 4, p. 315-321, 2008.

MLADENOVIC, K. G. et al. *Enterobacteriaceae* in food safety with an emphasis on raw milk and meat. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 105, n. 23, p. 8615-8627, 2021.

QIAN, Weidong et al. Antimicrobial activity of eugenol against carbapenem-resistant *Klebsiella pneumoniae* and its effect on biofilms. **Microbial pathogenesis**, v. 139, p. 103924, 2020.



Pró-Reitoria de Pesquisa e
Pós-Graduação



ULANOWSKA, Magdalena; OLAS, Beata. Biological Properties and prospects for the application of eugenol—A review. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 7, p. 3671, 2021.

YADAV, Mukesh Kumar et al. Eugenol: a phyto-compound effective against methicillin-resistant and methicillin-sensitive *Staphylococcus aureus* clinical strain biofilms. **PLoS One**, v. 10, n. 3, p. e0119564, 2015.