

“Do conhecimento acadêmico à transformação sustentável: inovação com validação científica”

DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO MÍNIMA INIBITÓRIA DO EUGENOL FRENTE ÀS BACTÉRIAS *STAPHYLOCOCCUS EPIDERMIDIS* ATCC 12228, *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* ATCC 27853 E *STAPHYLOCOCCUS AUREUS* SM010

VALENTIM, Paula Fernanda da Silva (IC)<sup>1</sup>; SACHS, Daniela (PQ)<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidade Federal de Itajubá

**Palavras-chave:** Atividade bacteriostática. Eugenol. Resistência bacteriana.

### Introdução

A resistência bacteriana constitui um dos maiores desafios da saúde pública global, associando-se ao aumento de casos de infecções de difícil tratamento, elevação da mortalidade e crescimento dos custos hospitalares (Ribeiro *et al.*, 2024; Cunha, Calado, Fonseca, 2019). Estima-se que cepas resistentes sejam responsáveis por dezenas de milhares de mortes anuais somente na América do Norte e Europa, com impacto econômico que ultrapassa bilhões de dólares (Giacomini *et al.*, 2021; Thorpe, Joski, Johnston, 2018).

O uso inadequado e prolongado de antibióticos, aliado à capacidade adaptativa dos microrganismos, tem favorecido o surgimento de cepas multirresistentes (Otri *et al.*, 2024). Neste contexto, medicamentos antimicrobianos utilizados para tratamento de infecções bacteriana não são mais efetivos contra bactérias resistentes. Portanto, a busca por alternativas terapêuticas tornou-se urgente e a investigação de novos compostos com potencial antimicrobiano é de extrema relevância (Morellá-Aucejo *et al.*, 2024).

Produtos de origem natural, como os óleos essenciais destacam-se por sua ampla gama de atividades biológicas e atuando em diferentes estruturas e processos bacterianos (Pancu *et al.*, 2021). Entre seus constituintes ativos, o Eugenol, encontrado em alta concentração no óleo essencial de cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*), tem atividade antimicrobiana relevante, com potencial no desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas contra microrganismos resistentes (Bernal, Hammann, Kloss, 2022).

Dessa forma, a presente pesquisa teve como objetivo determinar a Concentração Mínima Inibitória (CMI) do Eugenol contra cepas bacterianas de relevância clínica: *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Staphylococcus aureus* SM010, cepa clínica resistente. A avaliação do potencial bacteriostático do Eugenol mostra-se relevante, uma vez que a busca por novos agentes com esse perfil ainda representa uma estratégia terapêutica promissora, especialmente diante do

crescente cenário de resistência bacteriana a fármacos de ação bactericida direta (Ishak *et al.*, 2024).

### Metodologia

Para determinar a CMI, as cepas bacterianas *S. epidermidis* ATCC 12228, *P. aeruginosa* ATCC 27853 e *S. aureus* SM010 foram semeadas em placas de Tryptic Soy Agar (TSA) e incubadas por 24 h a 37 °C. Após esse período de tempo, as colônias isoladas foram repicadas em 5 mL de solução salina estéril a 0,9% até a turbidez de 0,5 McFarland. Esse procedimento foi realizado para se obter uma turvação padronizada dos inóculos bacterianos, com aproximadamente  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL de bactérias nesta suspensão.

Em uma placa estéril de 96 poços, adicionou-se 90 µL de BHI em todos os poços das colunas 1, 2, 3, 5, 6 e 7. Posteriormente, preparou-se soluções contendo Eugenol com concentrações variando entre 40 mg/mL – 12 mg/mL (correspondendo aos eppendorf A - H). A partir disso, adicionou-se 10 µL do Eugenol nos poços 1A-H, 2A-H e 3A-H de cada solução preparada, onde as concentrações finais nos poços foram de: A - 2000 µg/mL, B - 1800 µg/mL, C - 1600 µg/mL, D - 1400 µg/mL, E - 1200 µg/mL, F- 900 µg/mL, G - 700 µg/mL, e H - 600 µg/mL.

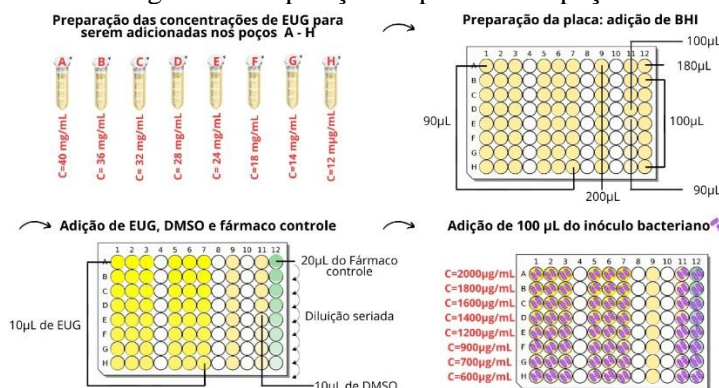
Em toda coluna 9 adicionou-se 200 µL de BHI, referente ao controle negativo da placa para evidenciar a esterilidade do meio. Nos poços A, B, C e D da coluna 11 adicionou-se 100 µL de BHI, enquanto que nos poços E, F, G e H da mesma coluna aplicou-se 90 µL de BHI e 10 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Na coluna 12A, foi adicionado 180 µL no poço A e posteriormente 20 µL de uma solução de um fármaco de referência para o controle positivo da bactéria em estudo (Vancomicina para a bactéria Gram-positiva e Ciprofloxacina para a bactéria Gram-negativa). Em todas as colunas 1, 2, 3, 5, 6, 7, 11 e 12 aplicou-se 100 µL do inóculo bacteriano. A Figura 1 ilustra os procedimentos descritos.

A placa foi levada à estufa, a 37 °C por 24 h. Após esse período, aplicou-se 10 µL de resazurina e levou novamente à estufa por 1 h. Com a aplicação do

“Do conhecimento acadêmico à transformação sustentável: inovação com validação científica”

referido corante, tem-se a leitura visual: a coloração rosa indica crescimento bacteriano e a coloração azul indica ausência de crescimento. O CMI é definido como a menor concentração do fármaco capaz de inibir o crescimento visível da cultura bacteriana.

Figura 1 - Preparação da placa de 96 poços

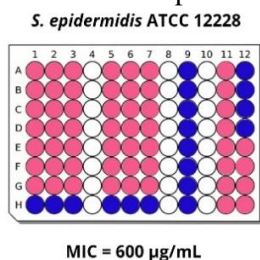


Fonte: Autoras.

### Resultados e discussão

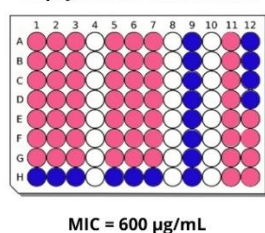
Os ensaios *in vitro* demonstraram que o Eugenol teve um CMI de 600 µg/mL contra as cepas *S. epidermidis* ATCC 12228 e *S. aureus* SM010. Frente a bactéria gram-negativa *P. aeruginosa* ATCC 27853 o valor de CMI foi maior, correspondente a 900 µg/mL. Esses resultados podem ser visualizados nas Figuras 2, 3 e 4, respectivamente, que ilustram esquematicamente a leitura da placa.

Figura 2 – Placa de CMI para *S. epidermidis*



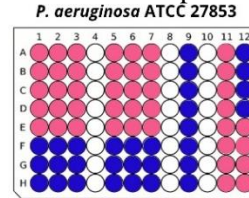
Fonte: Autoras.

Figura 3 – Placa de CMI para SM010 *Staphylococcus aureus* SM010



Fonte: Autoras.

Figura 4 – Placa de CMI para *P. aeruginosa*



MIC = 900 µg/mL

Fonte: Autoras.

Na literatura, observa-se valores de CMI menores para o Eugenol. Sharma *et al.* (2017) obteve em seus estudos CMI de 250 µg/mL do Eugenol contra a cepa *S. epidermidis* MTCC 435. Para a bactéria *P. aeruginosa* ATCC 27853, a mesma deste trabalho, Mandal, Dias e Franco (2017) constataram CMI de 32 µg/mL.

A cepa *S. aureus* SM090 corresponde a uma MRSA (*Staphylococcus aureus* *Meticilina* *Resistente*) isolada clínica do Hospital Universitário Clementino Fraga Filho (HUCFF), situado no Rio de Janeiro. Os autores Al-Shabib *et al.* (2017) estudaram diversas cepas MRSA e identificaram que a CMI variou de 42 a 665 µg/mL.

Essa diferença entre os valores da literatura pode estar relacionada as diferenças nas condições experimentais, incluindo a pureza do Eugenol, o método empregado, meio de cultura, a cepa utilizada e a carga bacteriana inoculada (Alves *et al.*, 2008). Em concordância com isso, estudos indicam que a atividade do eugenol pode variar de acordo com a cepa investigada (Ribeiro *et al.*, 2024).

### Conclusões

O estudo microbiológico demonstrou que o Eugenol apresenta ação antibacteriana tanto contra cepas gram-positivas quanto contra a estirpe gram negativa testada.

### Agradecimentos

À Universidade Federal de Itajubá, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa PIBIC CNPq e a Fundação ao Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG -APQ-01956-23).

### Referências

AL-SHABIB, N. A. *et al.* Eugenol inhibits quorum sensing and biofilm of toxigenic MRSA strains isolated from food handlers employed in Saudi Arabia. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 31, n. 2, p. 387-396, 2017.

**“Do conhecimento acadêmico à transformação sustentável: inovação com validação científica”**

ALVES, E. G. *et al.* Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química nova**, v. 31, p. 1224-1229, 2008.

BERNAL, F. A.; HAMMANN, P.; KLOSS, F. Natural products in antibiotic development: is the success story over? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 78, n. 102783, 2022.

CUNHA, B. R.; FONSECA, L. P.; CALADO, C. R. C. Antibiotic discovery: where have we come from, where do we go?. **Antibiotics**, v. 8, n. 45, p. 1-21, 2019.

GIACOMINI, M. *et al.* Evidence of antibiotic resistance from population-based studies: a narrative review. **Infection and Drug Resistance**, v. 14, p. 849-858, 2021.

ISHAK, A. *et al.* Bactericidal versus bacteriostatic antibacterials: clinical significance, differences and synergistic potential in clinical practice. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 80, n. 1, p. 1-17, 2024.

MANDAL, S. M.; DIAS, R. O.; FRANCO, O. L. Phenolic compounds in antimicrobial therapy. **Journal of Medicinal Food**, v. 20, n. 10, p. 1031-1038, 2017.

MORELLÁ-AUCEJO, A. *et al.* Remarkable Enhancement of Cinnamaldehyde Antimicrobial Activity Encapsulated in Capped Mesoporous Nanoparticles: a New “Nanokiller” Approach in the Era of Antimicrobial Resistance. **Biomaterials Advances**, v. 160, p. 213840, 2024.

OTRI, I. *et al.* Exploring the Synergy between Nano-Formulated Linezolid and Polymyxin B as a Gram-Negative Effective Antibiotic Delivery System Based on Mesoporous Silica Nanoparticles. **Nanomaterials**, v. 14, n. 2, p. 228, 2024.

PANCU, D. F. *et al.* Antibiotics: conventional therapy and natural compounds with antibacterial activity — a pharmacotoxicological screening. **Antibiotics**, v. 10, n. 401, p. 1-35, 2021.

RIBEIRO, M. *et al.* Eugenol as a promising antibiofilm and anti-quorum sensing agent: a systematic review. **Microbial Pathogenesis**, v. 196, n. 106937, 2024.

SHARMA, G. *et al.* (2017). Inhibitory effect of cinnamaldehyde alone and in combination with thymol, eugenol and thymoquinone against *Staphylococcus epidermidis*. **Journal of Herbal Medicine**, 9, 68-73.

THORPE, K. E.; JOSKI, P.; JOHNSTON, K. J. Antibiotic-resistant infection treatment costs have doubled since 2002, now exceeding \$2 billion annually. **Health Affairs**, v. 37, n. 4, 2018.