UNILEÃO
CENTRO UNIVERSITÁRIO LEÃO SAMPAIO
CURSO DE GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA

JÚLIO CÉSAR SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO EUGENIOL ASSOCIADO AO LED AZUL

Juazeiro do Norte – CE
2018

JÚLIO CÉSAR SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO EUGENIOL ASSOCIADO AO LED AZUL

Artigo científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Esp. Rakel Olinda Macedo da Silva.

Juazeiro do Norte – CE
2018

JÚLIO CÉSAR SILVA

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA E MODULADORA DO EUGENIOL ASSOCIADO AO LED AZUL

Artigo científico apresentado à Coordenação do Curso de Graduação em Biomedicina do Centro Universitário Leão Sampaio, em cumprimento às exigências para a obtenção do grau de bacharel em Biomedicina.

Orientador: Esp. Rakel Olinda Macedo da Silva.

Data de aprovação: ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

_____

Prof(a): Rakel Olinda Macedo da Silva
Orientador

_____

Prof(a): Fabiola Fernandes Galvão Rodrigues
Examinador 1

_____

Prof(a): Tassia Thaís Al Yafawi
Examinador 2

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE BACTERIANA E MODULADORA DO EUGENOL ASSOCIADO AO LED AZUL

Júlio César Silva[1], Rakel Olinda Macedo da Silva[2]

[1] Discente do curso de biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio
[2] Docente do curso de biomedicina do Centro Universitário Doutor Leão Sampaio

RESUMO

O presente estudo objetiva avaliar a atividade antibacteriana e moduladora do eugenol em associação com a luz de LED azul. A atividade antibacteriana e moduladora foi avaliada por meio do método de contato gasoso com uso da luz de LED azul e de antibióticos (amicacina, ciprofloxacina, gentamicina e norfloxacina). Os testes foram realizados em triplicata, submetidos a análise estatística ANOVA com valores considerados significantes quando $p<0,05$. A análise antibacteriana demonstrou que o eugenol é um potencial composto antibacteriano, principalmente por seu efeito na degeneração da membrana de microrganismos, com ênfase nas cepas padrão e multirresistentes de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*. Quanto a propriedade moduladora, para amicacina e ciprofloxacina foi observado antagonismo quando verificado a interação com o eugenol e também com o LED. Para gentamicina e norfloxacina os valores obtidos revelaram resultados não significativos, em conformidade com os parâmetros da análise estatística e com valores de $p<0,05$. Estes resultados são importantes para estudos e pesquisas futuras, principalmente no que concerne a terapêutica e ação inibitória de produtos naturais frente a cepas multirresistentes e como essas propriedades podem ser intensificadas por meio do LED azul.

Palavras-chave: *Escherichia coli*. Eugenol. Fototerapia. Produtos naturais. *Staphylococcus aureus*.

ABSTRACT

The present study aims to evaluate the antibacterial and modulatory activity of eugenol in association with blue LED light. The antibacterial and modulatory activity was evaluated using the gaseous contact method with blue LED light and antibiotics (amikacin, ciprofloxacin, gentamicin and norfloxacin). The tests were performed in triplicate, submitted to statistical ANOVA analysis with values considered significant when $p <0.05$. The antibacterial analysis demonstrated that eugenol is a potential antibacterial compound, mainly for its effect on the membrane degeneration of microorganisms, with emphasis on the standard and multiresistant strains of *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. As for the modulating property, was observed antagonism for amikacin and ciprofloxacin when the interaction with eugenol and also with LED was verified. For gentamicin and norfloxacin the values obtained showed non-significant results, according to the parameters of the statistical analysis and with values of $p <0.05$. These results are important for future studies and research, especially regarding the therapeutic and inhibitory action of natural products against multiresistant strains and how these properties can be intensified through blue LED.

Keywords: *Escherichia coli*. Eugenol. Phototherapy. Natural products *Staphylococcus aureus*.

1- INTRODUÇÃO

O uso terapêutico de plantas medicinais é uma prática comum às comunidades indígenas do Brasil colonial. Esse conhecimento se perpetuou com o passar dos anos, em especial pelos portugueses, culminando no habitual costume atrelado a medicina tradicional (BRASIL, 2012).

Com a utilização desregrada dos antimicrobianos e a emergência de métodos eficazes para tratamento das enfermidades de caráter bacteriológico a prevalência do processo de resistência tornou-se preponderante, culminando em altas taxas de mortalidade e custos em saúde (SANGLARD, 2016). Considerando-se esses fatores, os produtos naturais apresentam-se atualmente como recursos norteadores de estudos relacionados a minimização de problemas como o citado, por suas propriedades adjuvantes para as drogas existentes (CIRINO, 2014; SILVA, 2015).

O eugenol é um composto fenilpropênico, que pode ser obtido de espécies como *Syzigium aromaticum*, com uso atrelado a minimização de fatores como toxicidade, resistência e encarecimento de custos, tendo sua utilização sido ainda mais estudada atualmente (PINHEIRO, 2017). De acordo com Gazolla et al. (2018)**,** esse composto aromático possui excelente ação frente à citotoxicidade além de potencial propriedade antimicrobiana.

Dois dos principais microrganismos comumente correlacionados a infecções e resistência são *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, ambas pertencentes a microbiota humana. A primeira, é um bacilo Gram-negativo e que quando patogênica pode ocasionar infecções urinárias, gastrointerites e sepse. A segunda, apresenta-se morfologicamente como cocos, são Gram-positivas e pode desencadear de infecções simples a mais graves (FUCCI et al., 2013; TIZOTTI et al., 2011).

Ainda não muito utilizado clinicamente, o *Light Emithing Diodes* (LED) apresenta-se como uma ferramenta promissora altamente eficaz no uso antimicrobiano (MEYER et al., 2010), principalmente quando analisado o seu custo benefício com produção de alta carga de irradiação, baixo consumo de energia, larga potência, baixa intensidade e durabilidade útil considerável (MOREIRA, 2009). A opção pela cor azul levou em consideração o estudo de MATIAS et al. (2017), em que foi apresentada uma maior eficácia dessa em virtude de seu baixo comprimento de onda, quando comparado com outras colorações.

Desse modo, o estudo dos efeitos biológicos do eugenol representa acima de tudo uma nova possibilidade para tratamento dos agravantes supracitados, contribuindo com a

minimização das implicações ocasionadas principalmente pela prevalência de casos de multirresistência, uma grande preocupação da saúde pública atual (SILVA, 2009). Pretende-se assim, avaliar a atividade antimicrobiana e moduladora do eugenol analisando os seus efeitos na presença de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* de modo a testar também os impactos da utilização do LED azul nesse estudo e na intensificação das propriedades deste composto.

2- MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MATERIAL

Os discos com antibióticos (amicacina, ciprofloxacina, gentamicina e norfloxacina) foram obtidos de LaborClin, Brasil. Os meios de cultura foram adquiridos de HIMEDIA, India e foram preparados segundo as especificações do fabricante e esterilizado em autoclave de vapor quente. O eugenol foi obtido de Sigma ChemicalCo, St. Loius, MO, EUA. O aparelho de LED utilizado durante o procedimento experimental foi o *Light Emithing Diodes*- LED, um diodo emissor de luz, da marca NEW Estética o qual possui espectros de luz amarelo, azul e vermelho permitindo também a combinação dessas cores. A luz utilizada foi a de cor azul, com comprimento de onda pré-determinado pelo aparelho de 415 nm.

2.2 LINHAGENS BACTERIANAS

Foram utilizadas as linhagens multirresistentes de isolados clínicos *Escherichia coli* 27 e *Staphylococcus aureus* 358. As linhagens padrão *Escherichia coli* ATCC 10536 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 também foram utilizadas e obtidas do Instituto Oswaldo Cruz. Todas estas foram mantidas em *Agar Infusão de Coração* (AIC). Para realização dos testes, as linhagens foram suspendidas em tubo de ensaio contendo solução salina para se obter uma suspensão com turvação equivalente a 0,5 da escala de McFarlland ($1x10^8$ UFC/mL).

2.3 TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA POR CONTATO GASOSO

Para realização do semeio em tapete dos microrganismos, foram utilizadas placas de *Petri* contendo *Mueller Hinton Agar*. Discos de papéis filtro semelhantes aos do antibiograma foram colocados no centro da placa sobre o semeio e 10µL do composto foi acrescentado na tampa de cada placa. Para determinação dos halos de inibição, as placas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Os testes foram realizados em triplicata e para medição dos halos de inibição foi utilizada uma régua milimetrada (SILVA; CARVALHO, MATIAS, 2016).

2.4 TESTE DE AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MODULADORA POR CONTATO GASOSO

A atividade moduladora por contato gasoso em placas contendo *Mueller Hinton Agar* foi realizada por meio da metodologia modificada por Inouye; Takizawa, Yamagushi (2001). Foram utilizados discos de antibióticos: amicacina, ciprofloxacina, gentamicina, norfloxacina. As placas foram divididas em grupos nos quais foram invertidas e adicionadas em suas tampas 10 µL do eugenol, permitindo que a partir da volatilização ocorresse a interação com os discos. Outras placas foram preparadas sem o composto para posterior comparação. Para determinação do halo de inibição as placas foram incubadas na estufa a 37°C por 24h. Os testes foram realizados em triplicata e para medição dos halos foi usado régua milimetrada.

2.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE MUDULADORA COM EXPOSIÇÃO AO LED

Para determinação deste teste foi utilizada a mesma metodologia referente ao teste de avaliação da atividade antibacteriana e moduladora por contato gasoso. As placas foram divididas em 2 grupos. O primeiro foi submetido a luz de LED azul por um tempo de 20 minutos para cada placa e o segundo não foi submetido ao LED. As placas foram incubadas a 35° ± 2°C, durante 24h. Os testes foram realizados em triplicata e para determinação dos halos foi utilizada régua milimetrada.

2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram expressos em média aritmética ± desvio padrão avaliados estatisticamente através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo pós-teste *Bonferroni* utilizando o software *GraphPad Prism*, com diferenças consideradas significativas quando $p<0,05$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise da atividade antibacteriana revelou que o eugenol possui considerável efeito inibidor no crescimento de bactérias, visto que para os testes com e sem LED houve a formação de halo na região em que ocorreu o contato gasoso entre o óleo e o disco absortivo. Ao serem expostas à luz de LED notou-se intensificação do mesmo processo por meio do aumento do halo em todos os microrganismos testados, conforme descrito na tabela 1.

TABELA 1: Média aritmética dos halos de inibição em milímetro na atividade antibacteriana com e sem exposição ao LED

MICRORGANISMOS TESTADOS	SEM LED	COM LED
Escherichia coli 27	12,6	14,0
Escherichia coli ATCC10536	12,3	13,3
Staphylococcus aureus 358	12,0	17,0
Staphylococcus aureus ATCC 25923	10,3	11,6

Fonte: Próprio autor, 2018

Levando-se em consideração a correlação, apresentada por Cimanga et al. (2002), entre a média aritmética dos halos de inibição e a propriedade antibacteriana dos óleos essenciais por meio da metodologia de disco-difusão, observa-se que a média obtida no teste com o eugenol é considerada como ativa na inibição do crescimento de microrganismos, por seu valor superior a 10 mm. Quando a média dos halos fosse inferior

a 10mm os resultados não seriam considerados na atividade antibacteriana, já quando superiores a 15mm seriam interpretados como alta efetividade.

O efeito antibacteriano do eugenol foi mencionada por Gomes e colaboradores (2018) por meio do estudo da composição química, efeito citotóxico e propriedades do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia). Neste o eugenol é apresentado como o composto majoritário (52,53%) do óleo essencial, mediante realização de cromatografia gasosa e espectrometria de massas. Já o padrão dos resultados deste teste para *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* foi confirmado por Rodella (2015), onde se foi apresentada atividade antimicrobiana para estas duas cepas, por meio da metodologia de disco difusão.

Um conjunto de fatores colaboram para as informações apresentadas, principalmente a alta penetrabilidade na membrana citoplasmática promovida pelo eugenol, ocasionando rompimento, aumento da permeabilidade e gerando extravasamento do conteúdo celular com efeito bactericida e sendo este um importante mecanismo na diminuição da probabilidade de resistência (DEVI et al., 2010).

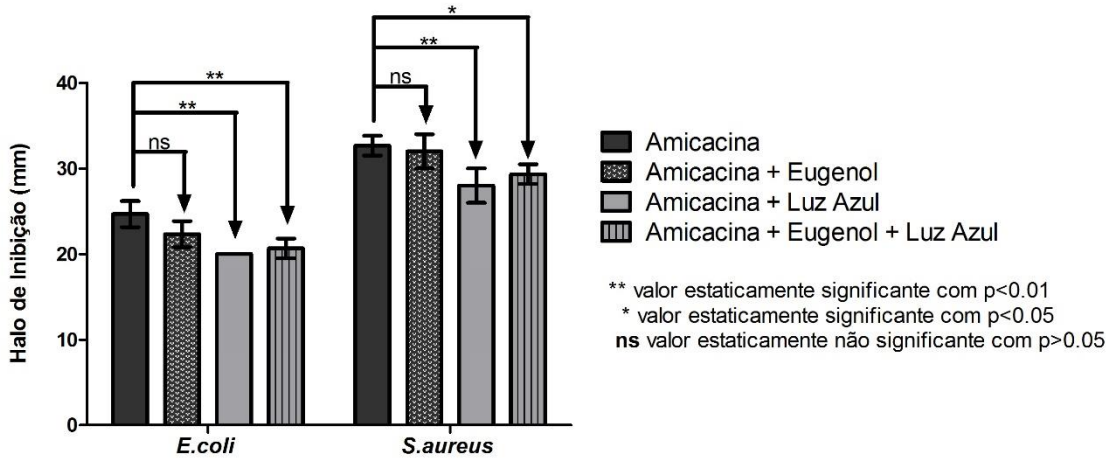
Muitos dos óleos essenciais, em que o eugenol e outros aldeídos estão presentes possuem um considerável efeito na síntese de proteínas bacterianas, provocando danos à estrutura de sua parede (MATAN et al., 2006). A ação antimicrobiana do eugenol está intrinsicamente correlacionada a sua estrutura fenólica, que em altas concentrações resultam em danos na estrutura membranosa de bactérias, em decorrência da degeneração de proteínas presentes em sua composição (LINARD, 2008).

O LED, por sua vez, além de induzir alterações bioquímicas na membrana pode ocasionar inibição da respiração celular, ao afetar a mitocôndria, dissolução e impedimento da divisão celular, devido a inativação de enzimas metabólicas e também o aumento da permeabilidade bacteriana. (GREBENOVÁ et al., 2003). A escolha pela coloração azul levou em consideração sua alta penetrabilidade e intensidade do espectro garantido por seu baixo comprimento de onda que lhe garante eficácia maior se comparado com os de outras colorações (MATIAS, 2017).

Quando se observa o efeito modulador do eugenol, buscou-se montar associações correlacionadas ao halo formado nas placas com antibióticos e a interação do composto e do LED com este. A avaliação dos resultados deu subsídios para a interpretação de possível antagonismo, sinergismo ou indiferença, apresentados por meio de recursos gráficos.

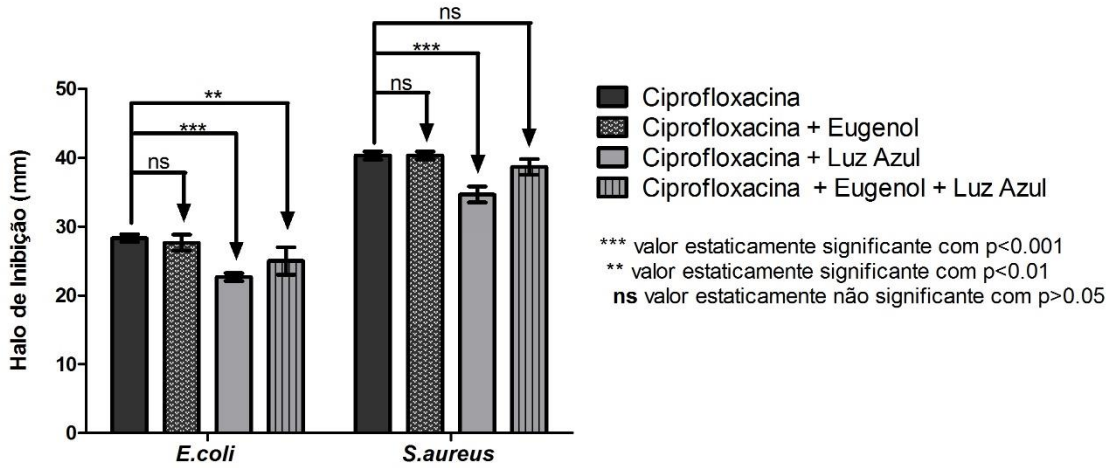
Dos antibióticos testados, dois obtiveram resultados significativos: amicacina e ciprofloxicina. O gráfico 1 permite a visualização de antagonismo perceptível entre a amicacina e o eugenol, assim como para o composto, antibiótico e LED. Infere-se o mesmo padrão para ciproflaxicina, quando visto o gráfico 2. Esses resultados se repetem tanto para *Escherichia coli* (Gram-negativa) quanto para *Staphylococcus aureus* (Gram-positiva).

GRÁFICO 1: Avaliação da atividade moduladora do eugenol junto a amicacina com e sem o LED



Fonte: Próprio autor, 2018.

GRÁFICO 2: Avaliação da atividade moduladora do eugenol junto a ciprofloxacina com e sem o LED

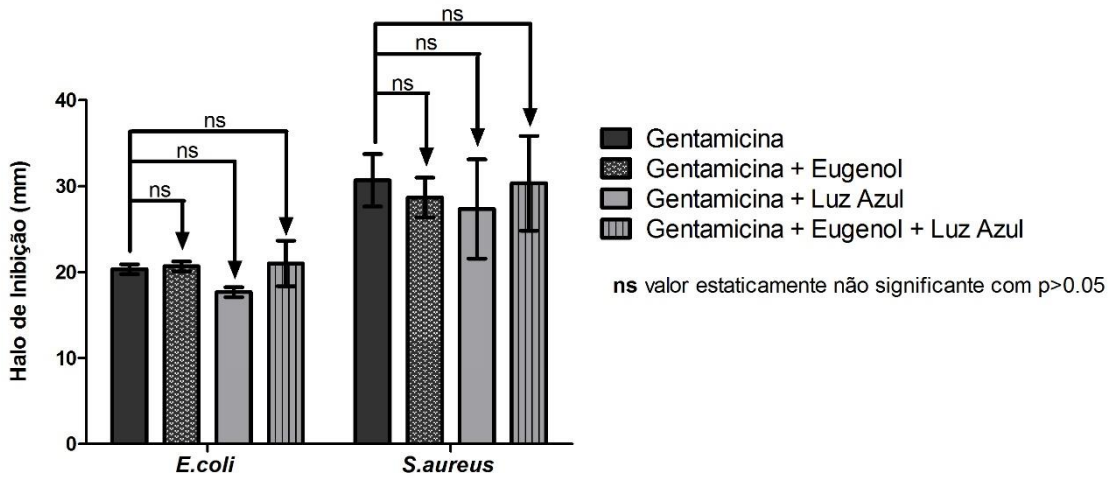


Fonte: Próprio autor, 2018.

Estes processos que envolvem o antagonismo entre antibióticos e produtos de origem vegetal são comuns quando levado em consideração a associação de extratos e fármacos podendo ser justificados pela quelação mútua (GRANOWITZ E BROWN, 2008; COUTINHO et al., 2015). A partir disso, a resposta moduladora pode ser comprometida por um evento estérico, por meio da substituição da hidroxila de um determinado composto, que origina a quelação (BARREIROS et al., 2006).

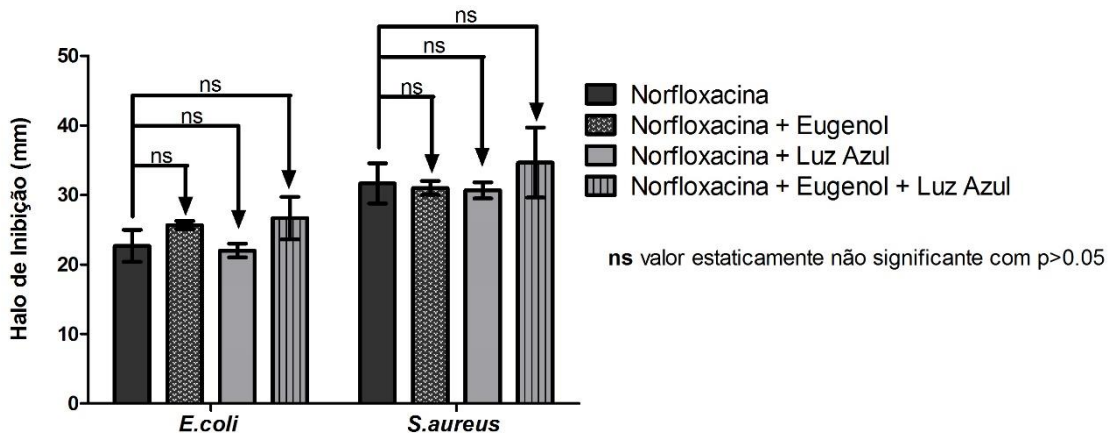
Os gráficos 3 e 4 apresentam dados não significativos correlacionados a gentamicina e norfloxacina, em todas as situações de interesse para esse estudo e já descritas anteriormente.

GRÁFICO 3: Avaliação da atividade moduladora do eugenol junto a gentamicina com e sem o LED



Fonte: Próprio autor, 2018.

GRÁFICO 4: Avaliação da atividade moduladora do eugenol junto a norfloxacina com e sem o LED



Fonte: Próprio autor, 2018.

Cabe ressaltar ainda, que os dados apresentados não devem ser utilizados como forma de se generalizar os efeitos e propriedades do LED e de outros óleos essenciais em conjunto com antibióticos. Análises realizadas com o óleo essencial de *Ossimum gratissimum*, por exemplo, apresentaram satisfatórias propriedades de sinergismo do eugenol com amicanina para ambas as cepas de interesse nesse estudo. e também antagonismo entre o composto e gentamicina, dessa vez, quando levado em consideração a bactéria *Staphylococcus aureus* testados por meio da metodologia de contato gasoso (SILVA, 2015).

4 CONCLUSÃO

Os resultados obtidos demonstraram que o eugenol é um composto capaz de inibir o crescimento de microrganismos, pela metodologia de contato gasoso, com esta intensificada pela luz de LED azul. Já quando associado a antibióticos o eugenol exerce efeito antagônico notável também quando verificado a atuação fototerápica do LED. Estas descobertas são úteis para colaborar com novos estudos, no que concerne a terapêutica de infecções ocasionadas por bactérias, apresentando uma alternativa para inibição do crescimento de microrganismos, por meio de um produto de origem vegetal, e intensificação desse processo por meio da utilização do LED.

REFERÊNCIAS

BARREIROS, A. L. B. S. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113-123. 2006.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na atenção básica.** Brasília. 2012.

CIMANGA, K. et al. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology,** v. 79, n. 2, p. 213-220. 2002.

CIRINO, I. C. S. **Modulação da resistência a drogas por óleos essenciais em linhagens de *Staphylococcus aureus.*** 2014. 79 f. Dissertação (Mestrado em biologia celular e molecular), Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2014.

COUTINHO, H. D. M. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de Geraniol e Cariofileno sobre Staphylococcus aureus. **Revista cubana de plantas medicinales**, v. 20, n. 1, p. 98-105. 2015.

DEVI, N. P. et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane. **J Etenopharmacol**. v. 130, n. 1, p. 107-115. 2010.

FUCCI, A. P. B., et al. Avaliação da qualidade do processo de desinfecção em superfícies inanimadas de unidades básicas de saúde por pesquisa de biomarcadores. **Revista Uniara**, v.16, n.1. p. 183-190, 2013.

GAZOLLA, P. A. R. et al. Síntese e avaliação da atividade citotóxica de derivados do eugenol contendo núcleos 1,2,3-triazólicos. **Química nova,** v. 41, n. 5, p. 497-506. 2018.

GOMES, P. R. B. et al. Chemical characterization and cytotoxicity of clove essential oil *(Syzygium aromaticum).* **Revista colombiana de ciências químico-farmacêuticas**, v.47, n.1, p. 37-52. 2018.

GRANOWITZ, E. V.; BROWN, R. B. Antibiotic adverse reactions and drug interactions. **Care Clin**, v. 24, n. 2, p. 421- 442. 2008.

GREBRENOVÁ, D et al. Mitochondrial and endoplasmic reticulum stress-induced apoptotic pathways are activated by 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy in HL60 leukemia cells. **Journal photochem protobiol,** v. 69, n. 2, p. 71-85. 2003.

INOUYE, S.; TAKIZAWA, T.; YAMAGUCHI, H. Antibacterial activity of essential oils and their major constituints against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of antimicrobial chemoterapy**, v. 47, n. 5, p. 565-573, 2001.

LINARD, C. F. B. M. **Estudo do efeito antinociceptivo do eugenol.** 2008. 90 f. Dissertação (Mestrado em ciências fisiológicas). Universidade Estadual do Ceará. Fortaleza. 2008.

MATAN, N. Antimicrobial activity of cinnamon and clove oils under modified atmosphere conditions. **Journal Food Microbiol**, v. 107, n. 5, p. 180-185. 2006.

MATIAS, E. F. F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana e moduladora do óleo essencial de *Cordia Verbenacea* DC associados as luzes de LED. **Interfaces,** v. 5, n. 14, p. 7-14. 2017.

MEYER, P. F. et al. Avaliação dos efeitos do LED na cicatrização de feridas cutâneas em ratos Wistar. **Fisioterapia Brasil**, v.11, n. 6. p. 428-432, 2010.

MOREIRA, M.C. **Utilização de conversores eletrônicos que alimentam LEDs de alto brilho na aplicação em tecido humano e sua interação terapêutica.** 2009. Tese (Doutorado em Engenharia Elétrica) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2009.

PINHEIRO, L. S. **Atividade antifúngica de fenilpropenos eugenol e isoeugenol sobre as cepas de *Cryptococcus neoformans*.** 2017. 123 f. Tese (Doutorado em produtos naturais e sintéticos bioativos), Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2017.

RODELLA, F. M. **Extração e atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo-da-índia.** 2015. 80 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em química), Fundação Educacional do Município de Assis. Assis. 2015.

SANGLARD, D. Emerging threats in antifungal-resistant fungal pathogens. **Frontiers in medicine**, v. 3, n. 11, p. 1-10. 2016.

SILVA, M. F. ***Escherichia coli* e a resistência antibiótica: uma análise do padrão de evolução da resistência da *Escherichia coli* aos antibióticos no município de Castelo Branco, de 2006 a 2008.** 2009. 34 f. Dissertação (Mestrado em medicina), Universidade da Beira Interior. Covilhã. 2009.

SILVA, H. T. D. **Potencial de compostos fenólicos como antimicrobianos e/ou moduladores da resistência em *Staphylococcus aureus*.** 2015. 73 f. Dissertação (Mestrado em ciências da nutrição). Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa. 2015.

SILVA, M. K. N. **Perfil químico do óleo essencial de O*cimum gratissimum* l. e avaliação da atividade antibacteriana e moduladora de resistência à antibióticos pelo método de contato gasoso.** 2015**.** 23 f. Trabalho de conclusão de curso (graduação em biomedicina). Centro Universitário Doutor Leão Sampaio. Juazeiro do Norte. 2015.

SILVA, M. K. do N.; CARVALHO, V. R. de A.; MATIAS, E. F. F. Chemical profile of essential oil of *Ocimum gratissimum* L. and evaluation of antibacterial and drug resistance-modifying activity by gaseous contact method. **Phamacognosy Journal**, v. 8, n. 1, p. 4-9, 2016.

TIZOTTI, M. K. et al. Prevalência e perfil de sensibilidade de *Staphylococcus aureus* isolados em um hospital escola na cidade de Santa Maria, Brasil. **Saúde (Santa Maria)**, v. 36, n. 1, p. 47-56, 2011.