



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE CENTRO DE CIÊNCIAS  
E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR COORDENAÇÃO DO PROGRAMA DE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM SISTEMAS AGROINDUSTRIAIS - PPGSA**

**ODILON LÚCIO DE SOUSA NETO**

**O USO DO EUGENOL COMO AGENTE ANTIMICROBIANO PARA A  
AGROINDÚSTRIA**

**POMBAL – PB**

**2018**

ODILON LÚCIO DE SOUSA NETO

**O USO DO EUGENOL COMO AGENTE ANTIMICROBIANO PARA A  
AGROINDÚSTRIA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG), como parte das exigências legais para obtenção do título de Mestre.

**Área de Concentração:** Produção e Tecnologia Agroindustrial

**Orientadores:** Prof. D. Sc. João Paulo Natalino de Sá

Prof. D. Sc. Patrício Borges Maracajá

POMBAL – PB

2018

S725u

Sousa Neto, Odilon Lúcio de.

O uso do eugenol como agente antimicrobiano para a agroindústria /  
Odilon Lúcio de Sousa Neto. – Pombal, 2018.

26f. : il.

Artigo (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) – Universidade  
Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia  
Agroalimentar, 2018.

"Orientação: Prof. Dr. João Paulo Natalino de Sá".

"Co-orientação: Prof. Dr. Patrício Borges Maracajá"

1. Eugenol. 2. Eugenol - Efeito bactericida. 3. Eugenol -  
Características biológicas. 4. Eugenol - Características químicas. 5.  
Conservação de alimentos. 6. Tecnologia de alimentos. I. Sá, João Paulo  
Natalino de. II. Maracajá, Patrício Borges. III. Título.

CDU 633.83(043)

Ficha catalográfica elaborada pela bibliotecária Auxiliadora Costa CRB 15/716

**"O USO DE EUGENOL COMO AGENTE ANTIMICROBIANO PARA A AGROINDÚSTRIA"**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais do Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar da Universidade Federal de Campina Grande, Campus Pombal-PB, em cumprimento às exigências para obtenção do Título de Mestre (M. Sc.) em Sistemas Agroindustriais.

Aprovada em 22/05/2018

COMISSÃO EXAMINADORA



João Paulo Natalino de Sá  
Orientador



Patrício Borges Maracajá  
Examinador Interno



George do Nascimento Ribeiro  
Examinador Externo

POMBAL-PB  
MAIO - 2018

## **Agradecimentos**

Agradeço ao meu Deus, por ter me concedido força e vitória em todos os momentos de dificuldades que enfrentei. A Jesus seja atribuído toda honra e toda glória.

A minha genitora, Francisca, que sempre me ajudou na caminhada tanto maternal quanto apoio moral e educação ética; meu filho Gustavo Emanuel, minha esposa Marciana que mostrou-se compreensiva quando não disponho de tempo para a mesma; minha amiga Maria Auxiliadora que sempre me incentivou.

Agradeço ao meu orientador, Prof. D. Sc. João Paulo Natalino de Sá, pela paciência e disponibilidade de sempre estar engajado na orientação do meu trabalho, por ceder sua sabedoria, pois sem o seu auxílio, olhar apurado, não teria êxito nesta pesquisa.

Agradeço também ao orientador, Prof. D. Sc. Patrício Borges Maracajá, pelo empenho e dedicação no processo de acompanhamento na construção da minha pesquisa.

Agradeço a Doutoranda Aline Carla de Medeiros, a qual considero como irmã, pois a mesma sempre me apoiou em toda trajetória do mestrado, acredito que foi Deus que a colocou na minha caminhada para sempre estar me orientando nas tomadas de decisões e sempre me incentivando.

Aos professores do Mestrado em Sistemas Agroindustriais, da Universidade Federal de Campina Grande, pela contribuição e por estarem sempre disponíveis.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo”. (Albert Einstein)

## RESUMO

O Eugenol faz parte dos compostos aromáticos dentro da classe dos fenilpropenos, sendo descrito como 4-alil-2-metóxi-fenol, conhecido comumente como essência de cravo, pois está presente em grande quantidade no óleo essencial de cravo da Índia (*Eugenia aromática*). Possui várias atividades biológicas de acordo com a literatura dentre elas podemos destacar: atividades antifúngica, antibacteriana, antiparasitária, analgésicas, anti-inflamatória, anticarcinogênica e antioxidante, além de outras, como ação contra fitopatógenos e atuação no combate das bactérias de amplo espectro dos grupos Gram-positivas e Gram-negativas e, logo, comprova-se a sua importância na conservação dos alimentos quanto ao surgimento dos micróbios e sua aplicação nos alimentos como aditivo na própria embalagem. O objetivo deste estudo foi descrever e comparar através dos resultados da literatura a atividade antimicrobiana do Eugenol e a sua importância no elevado potencial inibitório de bactérias e fungos, como também o seu mecanismo de ação e uso. Trata-se de uma revisão da literatura que consistiu em descrever as características biológicas e químicas do Eugenol e as aplicações nas tecnologias e na conservação dos alimentos com atuação antibacteriana na agroindústria. De acordo com a literatura consultada o Eugenol foi capaz de inibir fortemente o crescimento deste fungo em torno de 19,16 a 95,83%; de uma maneira dependente da dose utilizada de Eugenol. A produção de aflatoxina B<sub>1</sub> também foi inibida em torno de 15,07 a 98,0% pelo composto. As expressões dos genes foram significativamente suprimidas pelo Eugenol em concentrações de 62,5 e 125 µg/mL. Os resultados indicaram que o Eugenol pode ser considerado uma boa alternativa para controlar o crescimento de fungos toxigênicos e a contaminação posterior em alimentos, como rações e produtos agrícolas contaminados por aflatoxinas. No que se refere aos aspectos tecnológicos o Eugenol também é ativo contra biofilmes pré-formados e age impedindo a formação de novos biofilmes de *C. albicans*, sugerindo sua eficácia contra os mecanismos adaptativos de resistência exibida por biofilmes dessa espécie contra antibióticos sintéticos como anfotericina B e fluconazol e com relação ao mecanismo de ação do Eugenol tem modo de ação similar ao fluconazol, inibindo a biossíntese do ergosterol. Observaram também que enquanto o fluconazol exibe ação fungistática, o Eugenol exerce atividade fungicida contra várias espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C. glabrata*), inclusive contra isolados resistentes ao fluconazol. Além disso, verificaram que o Eugenol é significativamente menos

citotóxico do que os antifúngicos disponíveis para uso clínico. Concluiu-se que o Eugenol tem efeito bactericida tanto em bactérias gram positivas como em gram negativas, devido atua na desintegração da estrutura da membrana celular microbiana, tendo como o extravasamento de constituintes citoplasmáticos.

Palavras-chave: Efeito Bactericida. Bactérias. Fungos. Antibióticos.



## ABSTRACT

Eugenol is part of the aromatic compounds within the class of phenylpropenes, being described as 4-allyl-2-methoxy-phenol, commonly known as clove essence, because it is present in large quantities in clove essential oil (*Aromatic eugenia*). It has several biological activities according to the literature, among which we can highlight: antifungal, antibacterial, antiparasitic, analgesic, anti-inflammatory, anticarcinogenic and antioxidant activities, as well as others, such as action against phytopathogens and action in the fight against bacteria of large groups Gram-positive and Gram-negative and, therefore, their importance in the conservation of the foods with regard to the emergence of the microbes and their application in food as an additive in the packaging itself is proven. The objective of this study was to describe and compare the results of the literature on the antimicrobial activity of Eugenol and its importance in the high inhibitory potential of bacteria and fungi, as well as its mechanism of action and use. It is a review of the literature that consisted in describing the biological and chemical characteristics of Eugenol and the applications in the technologies and the conservation of the foods with antibacterial action in the agroindustry. According to the literature consulted, Eugenol was able to strongly inhibit the growth of this fungus around 19.16 to 95.83%; in a manner dependent on the dose of Eugenol used. The production of aflatoxin B1 was also inhibited by about 15.07 to 98.0% by the compound. Gene expression was significantly suppressed by Eugenol at concentrations of 62.5 and 125 µg / mL. The results indicated that Eugenol can be considered as a good alternative to control the growth of toxigenic fungi and subsequent contamination in food, such as feeds and agricultural products contaminated with aflatoxins. As regards technological aspects, Eugenol is also active against preformed biofilms and acts to prevent the formation of new biofilms of *C. albicans*, suggesting its efficacy against the adaptive mechanisms of resistance exhibited by biofilms of this species against synthetic antibiotics such as amphotericin B and fluconazole and in relation to the mechanism of action of Eugenol has a mode of action similar to fluconazole, inhibiting ergosterol biosynthesis. They also observed that while fluconazole exhibits fungistatic action, Eugenol exerts fungicidal activity against several species of *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* and *C. glabrata*), even against fluconazole resistant isolates. In addition, they found that Eugenol is significantly less cytotoxic than the antifungal agents available for clinical use. It was concluded that Eugenol has a

bactericidal effect on both gram positive and gram negative bacteria, due to the disintegration of the microbial cell membrane structure, as well as the extravasation of cytoplasmic constituents.

**Keyword:** Bactericidal effect. Bacteria. Fungi. Antibiotics

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química do Eugenol .....	16
Figura 2 - Análise da morfologia por microscopia eletrônica de varredura da superfície celular de <i>S. aureus</i> multirresistente em células tratadas (B) e não tratadas (A) com Eugenol.....	19

## LISTA DE SIGLAS

IUPAC – International Union of Pure and Applied Chemistry

ATP – Adenosina trifosfato

PH – Potencial Hidrogeniônico

CIM – Concentração Mínima Inibitória

µg – Micrograma

ml – Mililitro

PKa – Constante de Acidez

g – Grama

mol – Massa Molecular

°C – Graus célsius

## SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
2. Objetivos.....	14
2.1 Objetivo geral .....	14
2.2 Objetivos Específicos .....	14
3. Metodologia.....	15
4. Referencial Teórico .....	15
4.1 Características biológicas e químicas do Eugenol.....	15
4.2 Aplicações tecnológicas do Eugenol .....	16
4.3 Aplicações do Eugenol na conservação de alimentos .....	17
4.4 O mecanismo de ação do Eugenol.....	21
5. Considerações finais.....	22
6. Referências Bibliográficas.....	23

## 1. Introdução

Atualmente, uma enorme variedade de conservantes naturais tem sido estudada em virtude das inúmeras aplicações práticas, os quais são utilizados na inativação de enzimas e microrganismos, sem comprometer as características físico químicas nas propriedades nutricionais e organolépticas dos alimentos. O Eugenol é uma substância química que faz parte dos compostos aromáticos dentro da classe dos fenilpropenos, visto que o mesmo apresenta uma capacidade considerável de combater as bactérias de amplo aspecto dos grupos Gram-positivas e Gram-negativas e, logo, comprova-se a sua grande importância na proteção dos alimentos quanto ao surgimento dos micróbios, sendo utilizado diretamente nos alimentos e muitas vezes como aditivo na própria embalagem.

A maioria dos alimentos possui composição intrínseca favorável ao desenvolvimento de microrganismos, o que diminui sua vida útil e algumas vezes os tornam risco à saúde do consumidor. Na tentativa de se utilizar técnicas naturais e eficazes de preservação dos alimentos, a adição de óleos essenciais torna-se potencial sistema de bioconservação, visto que podem prolongar a vida útil dos alimentos, controlando ou inibindo o crescimento microbiano (BRAGA, 2016).

Os estudos relatados mostram que os agentes antimicrobianos naturais descritos podem oferecer vantagens para o processamento de alimentos, uma vez que aumentam a sua vida útil e a segurança, além de permitirem aplicação de antimicrobianos naturais na conservação de alimentos que novos produtos com melhor qualidade e propriedades nutricionais sejam introduzidos no mercado. Todavia, por serem constituídos por diversos compostos químicos, apresentam respostas diferentes frente à diversidade microbiana e condições intrínsecas de cada alimento. Como a eficácia de todo antimicrobiano sofre influência da composição química do alimento, há necessidade de se determinar, com precisão, a condição mais efetiva de cada um deles para cada alimento.

Espera-se, em um futuro próximo, o aumento do uso de conservantes naturais em bens de consumo devido ao apelo do “consumismo verde”, que estimula o uso e o desenvolvimento de produtos naturais. Isso se aplica aos setores da cosmética, medicamentos e alimentos. A preocupação com a segurança de alimentos vem estimulando o estudo de agentes antimicrobianos em vários segmentos industriais e

meios científicos, para uso direto em alimentos ou incorporados em embalagens. Esses agentes antimicrobianos podem ter origem natural, como os óleos vegetais, ou origem química, podendo ser compostos orgânicos como o Eugenol.

O controle de micro-organismos deteriorantes e ou patogênicos veiculados por alimentos é alcançado principalmente por métodos químicos, mas o uso de alguns compostos químicos de origem sintética, vem se tornando indesejáveis por apresentarem alguns fatores limitantes como elevada carcinogenicidade, toxicidade aguda, teratogenicidade, entre outros. A percepção negativa de antimicrobianos sintéticos utilizados na área alimentícia vem despertando o interesse no uso de antimicrobianos de origem natural (FALEIRO, 2011).

As substâncias sintetizadas diretamente de sistemas biológicos sem alteração e ou modificação de sua estrutura química em laboratório, são reconhecidos como agentes antimicrobianos naturais (LI et al., 2011). Um antimicrobiano considerado como ideal seria aquele que está disponível em grandes volumes como um coproduto e reconhecido como seguro (GRAS) (CALLAWAY et al., 2011)

O objetivo deste estudo foi descrever e comparar a atividade antimicrobiana do Eugenol e a sua importância no elevado potencial inibitório de bactérias e fungos, como também o seu mecanismo de ação e uso.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo geral**

Descrever a atividade antimicrobiana do Eugenol.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Utilizar o Eugenol como conservante de alimentos;
- Determinar Diferentes atividades biológicas de Eugenol;
- Caracterizar o mecanismo de ação antimicrobiana do Eugenol;
- Comparar os resultados obtidos pela técnica de microscopia de varredura.

### **3. Metodologia**

Este estudo constitui-se de uma revisão da literatura especializada, cujo propósito consiste em descrever as características biológicas e químicas do Eugenol, além de suas aplicações tanto nas tecnologias e quanto na conservação dos alimentos com atuação antibacteriana na agroindústria.

Para o desenvolvimento desta pesquisa foi necessário recorrer a portais que possuem em sua plataforma um banco de dados acerca do tema. Adotado este critério de pesquisa foram utilizados para a consulta os bancos de dados do Scielo, Elsevier, PubMed, entre outros do Periódico Capes.

### **4. Referencial Teórico**

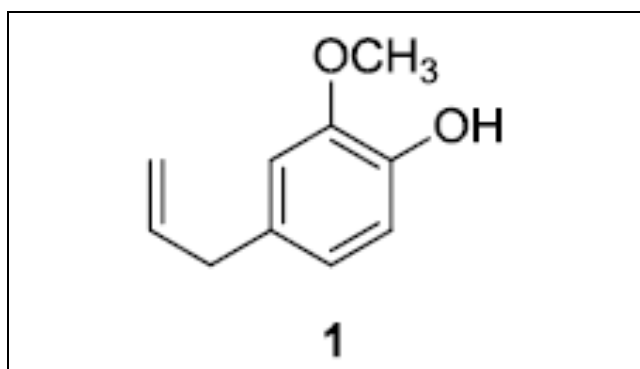
#### **4.1 Características biológicas e químicas do Eugenol**

O Eugenol é uma substância química que faz parte dos compostos aromáticos sendo muito versátil, pois vem sendo utilizado nos diversos ramos da indústria devido as suas características de efeito antibacteriana e antifúngico. As plantas são importantes fontes de moléculas biologicamente ativas, que apresentam papel no desenvolvimento de novos compostos com diferentes aplicações biológicas. Estas moléculas são sintetizadas pelo metabolismo secundário dos vegetais, que é capaz de gerar inúmeras moléculas. Dentre estas moléculas encontram-se a classe dos fenilpropenos, que fazem parte da constituição de alguns óleos essenciais (FIGUEIREDO et al., 2008).

A classe de fenilpropenos constitui uma subfamília entre os vários grupos de compostos orgânicos chamados fenilpropanóides, os quais são sintetizados a partir da fenilalanina nas plantas. A atividade antimicrobiana dos fenilpropenos depende do número e tipo de substituintes no anel aromático, da cepa microbiana e dos parâmetros utilizados nos testes experimentais, como meio de crescimento, temperatura, entre outros (PAULI & KUBECZKA, 2010).

Entre os fenilpropenos os mais pesquisados são o Eugenol, isoeugenol, vanilina, safrol e o cinamaldeído. O Eugenol, possui a estrutura molecular composta por  $C_{10}H_{12}O_2$ , sendo denominado pela International Union of Pure and Applied Chemistry, (IUPAC) por 4-Alil-2-metoxifenol (Figura 1), possuindo a massa molar de 164.2g /mol, com o  $pK_a$  de 10,19 a 25 °C (BARCELOUX, 2008).



**Figura 1 - Estrutura química do Eugenol**

O grupo fenólico presente em sua estrutura confere sua propriedade antioxidante. O Eugenol possui pouca afinidade por moléculas de água, e a sua solubilidade aumenta com a presença de solventes orgânicos. A cor do Eugenol pode variar de claro a amarelo pálido (BARCELOUX, 2008). Ao ser extraído primeiramente de folhas de *Eugenia caryophyllata* (cravo), é nomeado como Eugenol. Esta substância foi isolada pela primeira vez em 1929 e sua produção comercial teve início nos Estados Unidos em 1940. O Eugenol pode ser produzido sinteticamente, no entanto, é predominantemente extraído a partir de óleos essenciais (KAMATOU et al., 2012).

Diferentes atividades biológicas de Eugenol são reportadas pela literatura, incluindo atividades antifúngica (AHMAD et al. 2010), antibacteriana (DEVI et al. 2010), antiparasitária (UEDANAKAMURA et al. 2011), analgésicas (GUENETTE et al. 2006), anti-inflamatórias (DANIEL et al. 2009), anticarcinogênica (MANIKANDAN et al. 2010) e antioxidante (OLIVEIRA et al. 2007), além de outras, como ação contra fitopatógenos (VENTUROSIO et al. 2011), na inibição da produção de aflatoxina B<sub>1</sub> (OLIVEIRA et al. 2007) e na atividade antiviral (TRAGOOLPUA e JATISATIENR, 2007).

#### **4.2 Aplicações tecnológicas do Eugenol**

Tecnicamente, pode-se usar o Eugenol extraído o mesmo através de um método muito conhecido, que é o método da destilação. Ainda que, não seja tão simples, porque é necessário que seja feito de forma experimental, sendo necessários alguns itens para o procedimento. Depois de realizados os processos técnicos para obtenção do produto, são

possíveis que o resultado permita verificar o peso, o volume do Diclorometano e a massa final do Eugenol. A destilação a vapor é muito utilizada para destilar bebidas em geral, através de temperaturas dentro de câmaras de vapores.

Em estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, sugeriram que o Eugenol pode exercer sua ação antifúngica através da inibição de bombas de efluxo ( $H+ATP_{ase}$ ) na membrana celular fúngica, levando a acidificação intracelular e inativação celular (AHMAD, 2010). Em estudo mais recente, realizado por Darvishi et al. (2013), os autores descreveram que a ação antifúngica do Eugenol não está diretamente relacionada ao rompimento da membrana, como sugerido anteriormente. Relataram que o Eugenol interage com transportadores de aminoácidos aromáticos e com permease na membrana citoplasmática das células de levedura, o que pode alterar a sua permeabilidade ou causar alterações conformacionais, e esses fatores levariam ao rompimento celular.

O Eugenol também é ativo contra biofilmes pré-formados e age impedindo a formação de novos biofilmes de *C. albicans*, sugerindo sua eficácia contra os mecanismos adaptativos de resistência exibida por biofilmes dessa espécie contra antibióticos sintéticos como anfotericina B e fluconazol (SAJJAD et al., 2012). Além disso, vem sendo demonstrado que o Eugenol pode atuar como antifúngicos e inibidor da produção de microtoxinas, tais como a aflatoxina, por atuarem na regulação da peroxidação lipídica, inibindo a formação de peróxidos e consequente estresse oxidativo que está relacionado a biossíntese de aflatoxinas (OLIVEIRA et al., 2007).

#### **4.3 Aplicações do Eugenol na conservação de alimentos**

A conservação dos alimentos tem se tornado uma grande preocupação dos sistemas agroindustriais, e isto, tem motivado a comunidade científica para estudar agentes antimicrobianos, tais como, o Eugenol, que tem ação bactericida e fungicida e que pode garantir a segurança do alimento e prolongar a vida útil de prateleira.

Jahanshiri et al.(2015), avaliaram o efeito de Eugenol sobre o crescimento e na regulação à expressão de alguns *gens* envolvidos na biossíntese de aflatoxina por *Aspergillus parasiticus*. O fungo foi cultivado na presença de diferentes concentrações de Eugenol, que variaram de 15,62 - 500  $\mu\text{g/ mL}$  durante 3 dias a 28 °C. Os micélios foram secos e pesados como indicador de crescimento deste micro-organismo. A produção de aflatoxina foi avaliada por cromatografia. A expressão de genes envolvidos

na biossíntese de aflatoxina, tais como *ver-1*, *nor-1*, *pkxA*, *omtA* e *AFLR* foram avaliados por PCR em tempo real.

Neste estudo, o Eugenol foi capaz de inibir fortemente o crescimento deste fungo em torno de 19,16 a 95,83%; de uma maneira dependente da dose utilizada de Eugenol. A produção de aflatoxina B<sub>1</sub> também foi inibida em torno de 15,07 a 98,0% pelo composto. As expressões dos genes foram significativamente suprimidas pelo Eugenol em concentrações de 62,5 e 125 µg/mL.

Estes resultados indicam que o Eugenol pode ser considerado uma boa alternativa para controlar o crescimento de fungos toxigênicos e a contaminação posterior em alimentos, como rações e produtos agrícolas contaminados por aflatoxinas (JAHANSHIRI et al., 2015). Em relação à atividade antibacteriana, estudos conduzidos por Gill et al. (2006) relataram que o Eugenol é capaz de inibir a atividade de ATP<sub>ases</sub> ligadas às membranas de *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*, as quais estão envolvida na geração de ATP e na regulação do pH celular.

Foi observado ainda que, apesar de a inibição de ATP<sub>ases</sub> causar redução da velocidade de crescimento destes micro-organismos em concentrações subletais de Eugenol, prejudicando a sobrevivência das células, o mecanismo principal de ação do Eugenol foi a ruptura da membrana citoplasmática (GILL; 2006).

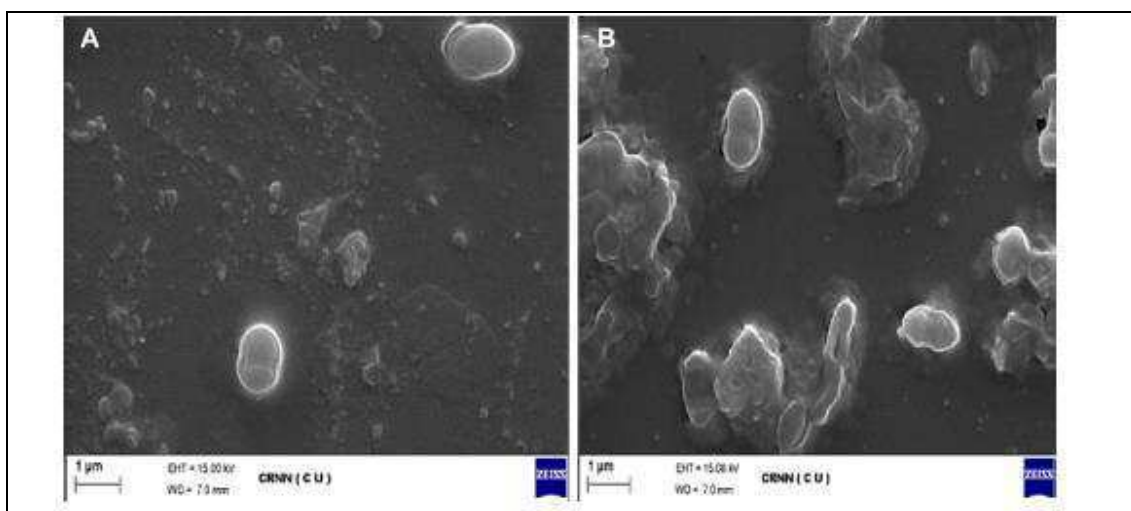
Essa ruptura foi confirmada também por outros autores como o principal mecanismo de ação antibacteriana do Eugenol contra *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris*, *Escherichia coli* (OYEDEMI, 2009) e *Salmonella typhi* (DEVI, 2010).

De acordo com dados da literatura, a atividade inibitória de materiais vegetais pode ser classificada em forte, moderada e fraca, que corresponde a concentração mínima inibitória (CIM) de até 500; entre 600 e 1.500; e acima de 1.600 µg/ mL, respectivamente (ALIGIANNIS et al., 2001). A forte atividade antimicrobiana exibida pelos compostos fenólicos é atribuída à interação dos grupos hidroxilas características de suas moléculas com as células da membrana plasmática microbiana, causando danos irreversíveis como hidrólise alterações no perfil de ácidos graxos e fosfolipídios e alteração do metabolismo energético e síntese de material genético (DONSI et al., 2014). Das et al. (2016) analisaram a ação antimicrobiana de Eugenol em estirpes multirresistentes de *Staphylococcus aureus* em diferentes concentrações deste composto, demonstrando uma atividade antimicrobiana forte dependente da dose de

Eugenol. O valor da concentração mínima inibitória (MIC) e a concentração mínima bactericida (MBC) foram respectivamente de 100 e 200  $\mu\text{g} / \text{ml}$ .

O efeito antimicrobiano de Eugenol poderia estar interligado a presença de fenilpropenos em sua estrutura, que poderia penetrar através da membrana celular e manter os efeitos inibitório e bactericida. Neste mesmo estudo, a morfologia da superfície celular foi estudada por microscopia eletrônica de varredura em células de *S. aureus* tratadas e não tratadas com Eugenol, como demonstrando na Figura 2 (DAS et al., 2016).

**Figura 2 - Análise da morfologia por microscopia eletrônica de varredura da superfície celular de *S. aureus* multirresistente em células tratadas (B) e não tratadas (A) com Eugenol**



Os resultados obtidos pela técnica de microscopia de varredura, demonstraram que a superfície controle das células bacterianas (células não tratadas com Eugenol, Fig. 2A) estavam intactas e com características morfológicas típicas de uma célula microbiana. Porém, células tratadas com a presença de Eugenol (Fig. 2B.), foram severamente danificadas. Algumas células mostraram elevado extravasamento do conteúdo celular, desuniformidade, e a presença de fragmentos e lacunas, reforçando a possível fragmentação da membrana celular (DAS et al. ,2016).

Estas mudanças morfológicas evidenciaram o aumento significativo na permeabilidade da membrana, que pode afetar o transporte citoplasmático, propiciado a incapacidade destas células em regular adequadamente o transporte através da membrana plasmática, resultando em sua inativação celular. Estes resultados sugerem

os possíveis mecanismos pelos quais o Eugenol possui ação antimicrobiana (DAS et al., 2016).

O Eugenol pode afetar alguns componentes celulares por induzir o colapso da membrana celular, resultando em formação de poros e eventual morte celular (DAS et al., 2016). A interação de Eugenol é realizada principalmente com a membrana citoplasmática das bactérias, por ser um composto de caráter hidrofóbico possui maior afinidade por superfícies de bactérias de caráter hidrofóbico. Embora existam relatos na literatura evidenciando a mesma concentração mínima inibitória (MIC), tanto para bactérias gram positivas como em gram negativas (FUJISAWA et al. 2002).

Xu et al. (2008) também atribuíram a atividade antibacteriana deste composto com a sua capacidade em permeabilizar e despolarizar a membrana citoplasmática de *Escherichia coli*. Para verificar esta ação realizaram a quantificação da fluorescência utilizando o iodeto de 3,3'-dietiloxacarbocianina (DIOC<sub>2</sub>) como corante. De acordo com os ensaios realizados, foi demonstrada a diminuição da intensidade absoluta da fluorescência em consequência das alterações ocasionadas sobre a permeabilidade da membrana, devido a sua interação com estes compostos.

Hammer & Heel (2012) também observaram por meio da utilização deste corante (DIOC<sub>2</sub>), que o Eugenol despolariza a maioria das células das bactérias gram-positivas, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus*, de forma dependente do tempo e da concentração. Na pesquisa realizada por Oyedemi et al. (2009), analisaram o possível mecanismo de ação antimicrobiana de três componentes presentes em óleos essenciais: Terpeneol,  $\alpha$ -terpineno e Eugenol, sob a membrana bacteriana de quatro estirpes bacterianas: *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* e *Escherichia coli*.

O estudo avaliou as alterações na composição da membrana celular através do extravasamento do conteúdo proteico e lipídico pelo método de Bradford e van Handel, respectivamente. O resultado revelou que células tratadas com Eugenol tiveram a membrana celular significativamente danificada, tanto em bactérias gram positiva como nas gram negativa. O teor de proteína tratadas com Eugenol,  $\gamma$ -terpineno e 4-terpineol, foram medidas para determinar o extravasamento de materiais intracelulares destas células.

Em os estirpes pesquisados (*P. vulgaris*, *E. coli*, *L. monocytogenes* e *S. pyogenes*) foi evidenciado uma tendência semelhante ao extravasamento de proteínas quando

tratadas com o Eugenol,  $\gamma$ -terpineno e 4-terpineol. O Eugenol no entanto, teve maior efeito prejudicial sob a degradação da parede celular, e aos danos à membrana citoplasmática. O extravasamento de proteínas pode ser utilizado como um indicador de dano à membrana e/ou parede celular causada pelo produto químico e ou agentes físicos, sugerido que a membrana e/ou parede celular é um alvo para a ação Eugenol (OYEDEMI et al., 2009). Pode-se prever que os diferentes efeitos observados estão relacionados a elevada hidrofobicidade do Eugenol, que permite a interação favorável com os lipídios presentes na membrana celular bacteriana, possibilitando a modificação na estrutura celular tornando-a mais permeáveis (SIKKEMA et al., 1994).

Nas pesquisas realizadas por Hemaiswarya & Doble (2009) reportaram os danos a nível da membrana celular em *S. aureus* e *E. coli* como possível mecanismo de ação do Eugenol. Hemaiswarya e Doble (2009) demonstraram ainda que os danos na membrana celular bactéria em ambas as estirpes, aumentaram a permeabilidade não seletiva da membrana. Este modo de ação pode favorecer os sinergismos de ação antimicrobiana a estas células tratadas com Eugenol e posteriormente com antibióticos.

A desintegração da membrana facilita a entrada dos antibióticos para o meio intracelular promovendo a atividade dos mesmos. Neste estudo verificaram que os antibióticos não específicos para bactérias gram negativa e gram positiva, tais como a vancomicina e oxacilina, se tornaram mais eficazes no combate das mesmas quando estas bactérias foram previamente expostas ao Eugenol, possível favorecido pela desintegração da membrana celular promovida pelo Eugenol (HEMAISWARYA e DOBLE, 2009).

#### **4.4 O mecanismo de ação do Eugenol**

O mecanismo de ação antimicrobiana do Eugenol ainda não está exatamente definido. Vários estudos têm sido conduzidos com objetivo de esclarecê-lo. Braga et al. (2007) concluíram que, em *Candida albicans*, o Eugenol afeta a regulação e função de enzimas importantes ligadas à membrana que catalisam a síntese de polissacarídeos da parede celular, desfavorecendo o crescimento das células e a morfogênese do envelope celular.

Ahmad et al. (2010), concluíram que o Eugenol tem modo de ação similar ao fluconazol, inibindo a biossíntese do ergosterol. Observaram também que enquanto o fluconazol exibe ação fungistática, o Eugenol exerce atividade fungicida contra várias espécies de *Candida* (*C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. parapsilosis*, *C. krusei* e *C.*

*glabrata*), inclusive contra isolados resistentes ao fluconazol. Além disso, verificaram que o Eugenol é significativamente menos citotóxico do que os antifúngicos disponíveis para uso clínico.

Em outro estudo realizado pelo mesmo grupo de pesquisa, sugeriram que o Eugenol também pode exercer sua ação antifúngica através da inibição de bombas de efluxo ( $H^+ATP_{ase}$ ) na membrana celular fúngica, levando a acidificação intracelular e inativação celular (AHMAD, 2010).

## 5. Considerações finais

Finalmente, os estudos supracitados evidenciam o efeito bactericida do Eugenol tanto em bactérias gram positivas como em gram negativas, pela possível ação deste composto na desintegração da estrutura da membrana celular microbiana, principalmente a nível da fração lipídica, pela maior interação hidrofóbica do Eugenol com os lipídios presente na constituição da membrana celular, favorecendo a alteração à permeabilidade da membrana citoplasmática, provocando o extravasamento de constituintes citoplasmáticos.

Importante ressaltar que a possível alteração do Eugenol na permeabilidade da membrana citoplasmática favorece o mecanismo quimiosmótico, permitindo o extravasamento do conteúdo citoplasmático, podendo interferir no metabolismo de proteínas, causando a desnaturação proteica e inativação celular.

A desintegração provocada pelo Eugenol na estrutura da membrana celular em micro-organismos pode ser também evidenciada pelas modificações estruturais destas células por técnicas de microscopia, como por exemplo, microscopia de varredura e microscopia de força atômica.

A atividade antimicrobiana de Eugenol em diferentes grupos microbianos é clara, mas o mecanismo de ação antimicrobiana ainda não está completamente entendido. Há consenso de que grande maioria dos compostos aromáticos e fenólicos exerce seus efeitos antimicrobianos diretamente na membrana citoplasmática, provocando alterações na sua estrutura e funções.

Apesar de inúmeras evidências dos possíveis do modo de ação antimicrobiana de Eugenol, mais estudos são necessários para validar o mecanismo de ação desta substância.

## 6. Referências Bibliográficas

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINOU, I. B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **J Agri Food Chem**, v.49, p. 4168-70, 2001.

AHMAD, A.; KHAN, A.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. In vitro synergy of eugenol and methyleugenol with fluconazole against clinical *Candida* isolates. **Journal of Medical Microbiology**, v. 59, n. 10, p. 1178–1184, 2010.

AHMAD, A.; KHAN, A.; YOUSUF, S.; KHAN, L. A.; MANZOOR, N. Proton translocating ATPase mediated fungicidal activity of eugenol and thymol. **Fitoterapia**, v. 81, n. 8, p. 1157–1162, 2010.

BARCELOUX, D.G. Medical Toxicology of Natural Substances. Foods, Fungi, Medicinal Herbs, **Plants and Venomous Animals**. Wiley: Hoboken, NJ, USA, 2008.

BRAGA, P. C.; DAL SASSO, M.; CULICI, M.; ALFIERI, M. Eugenol and thymol, alone or in combination, induce morphological alterations in the envelope of *Candida albicans*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 396–400, 2007.

CALLAWAY, T. R., CARROLL, J. A., ARTHINGTON, J. D., EDRINGTON, T. S., ANDERSON, R. C., RICKE, S. C. Citrus products and their use against bacteria: potential health and cost benefits (chap. 17). In R. Watson, J. L. Gerald, & V. R. Preedy (Eds.), *Nutrients, dietary supplements, and nutraceuticals: Cost analysis versus clinical benefits* (pp. 277e286). **New York, NY: Humana Press**, 2011.

CHORIANOPOULOS, N., KALPOUTZAKIS, E., ALIGIANNIS, N., MITAKU, S., NYCHAS, G.-J., HAROUTOUNIAN, S. A. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and



Thymus species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p 8261 - 8267, 2004.

DAS, B.; MANDAL, D.; DASH, S. et al. Eugenol Provokes ROS-Mediated Membrane Damage- Associated Antibacterial Activity Against Clinically Isolated Multidrug-Resistant *Staphylococcus aureus* Strains. **Infectious Diseases: Research and Treatment**, v. 9, p. 11-19, 2016.

DARVISHI, E.; OMIDI, M.; BUSHEHRI, A. A. S.; GOLSHANI, A.; SMITH, M. L. The antifungal eugenol perturbs dual aromatic and branched-chain amino acid permeases in the cytoplasmic membrane of yeast. **Plos One**, v. 8, n. 10, p. 1-9, 2013.

RESENDE, D. B. Síntese de glicosídeos de eugenol e análogos e avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* e em embalagens ativas/Déborah Braga Resende. – Lavras: UFLA, 2016.

DEVI, K. P.; NISHA, S. A.; SAKTHIVEL, R.; PANDIAN, S. K. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 107–115, 2010.

DONSI, F.; CUOMO, A.; MARCHESE, E.; FERRARI, G. Infusion of essential oils for food stabilization: unraveling the role of nanoemulsion-based delivery systems on mass transfer and antimicrobial activity. **Innovative Food Science and Engineering Technologies**, Amsterdam, v. 22, p. 212-220, 2014.

FALEIRO, M. L. The mode of antibacterial action of essential oils. Science Against Microbial Pathogens. **Communicating Current Research and Technological Advances**, v. 2, p.1143- 1156, 2011

FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; PEDRO, L.G.; SCHEFFER, J.J.C. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour Frag J**, v. 23, p.213–226, 2008.

FUJISAWA, S., ATSUMI, T., KADOMA, Y., SAKAGAMI, H. Antioxidant and prooxidant action of eugenol-related compounds and their cytotoxicity. **Toxicology**, v.177, p. 39–54, 2002.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPases of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, n. 111, p. 170–174, 2006.

GUENETTE, S. A. et al. Pharmacokinetics and anesthetic activity of eugenol in male Sprague–Dawley rats. **Journal of Veterinary Pharmacology and Therapeutics**, v. 29, n. 4, p. 265–270, 2006.

HAMMER K.A.; HEEL K.A. Use of multiparameter flow cytometry to determine the effects of monoterpenoids and phenylpropanoids on membrane polarity and permeability in *Staphylococci* and *Enterococci*. **Int. J. Antimicrob**, v.40, p.239-45, 2012.

HEMAISWARYA, S.; DOBLE, M. Synergistic interaction of eugenol with antibiotics against Gram negative bacteria. **Phytomedicine**, v. 16 (11), p.997–1005, 2009.

LI, M., MUTHAIYAN, A., O'BRYAN, C. A., GUSTAFSON, J. E., LI, Y., CRANDALL, P. G. Use of natural antimicrobials from a food safety perspective for control of *Staphylococcus aureus*. **Current Pharmaceutical Biotechnology**, v. 12, p. 1240 - 1254, 2011.

MANIKANDAN, P. et al. Eugenol induces apoptosis and inhibits invasion and angiogenesis in a rat model of gastric carcinogenesis induced by MNNG. **Life Sciences**, v. 86, n. 25/26, p. 936–941, 2010.

OLIVEIRA, M. D. S.; DORS, G. C.; SOARES, L. A. D. S.; FURLONG, E. B. Atividade antioxidante e antifúngica de extratos vegetais. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 18, n. 3, p. 267–275, 2007.

OYEDEMI, S. O.; OKOH, A. I.; MABINYA, L. V.; PIROCHENVA, G.; AFOLAYAN, A. J. The proposed mechanism of bactericidal action of eugenol,  $\alpha$ -terpineol and  $\gamma$ -terpinene against *Listeria monocytogenes*, *Streptococcus pyogenes*, *Proteus vulgaris* and *Escherichia coli*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 7, p. 1280–1286, 2009.

SAJJAD, M.; KHAN, A.; AHMAD, I. Antibiofilm activity of certain phytochemicals and their synergy with fluconazole against *Candida albicans* biofilms. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, p. 618–621, 2012.

TRAGOOLPUA, Y.; JATISATIENR, A. Anti-herpes simplex virus activities of *Eugenia caryophyllus* (Spreng.) Bullock & S. G. Harrison and essential oil, eugenol. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 1153–1158, 2007.

UEDA-NAKAMURA, T.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; MORGADO-DÍAZ, J. A.; MAZA, P. K.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99–105, 2011.

VENTUROSU, L. R.; BACCHI, L. M. A.; GAVASSONI, W. L. Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos. **Summa Phytopathologica**, v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

XU, J.; ZHOU, F.; JI, B.P.; PEI, R.S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Lett. Appl. Microbiol**, v. 47, p.174–179, 2008.