

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ISOEUGENOL FRENTE A *Klebsiella pneumoniae*

Isaac Moura Araújo¹;

Departamento de Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<http://lattes.cnpq.br/4804278307317640>

Francisca Daliane Severino da Silva²;

Departamento de Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<http://lattes.cnpq.br/4216348227755592>

Sara Tavares de Sousa Machado³;

Departamento de Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<http://lattes.cnpq.br/0133144032529157>

Guilherme Maciel Honor de Brito⁴;

Universidade Estadual do Ceará-UECE.

<http://lattes.cnpq.br/8143325544434884>

Leandro Marques Correia⁵;

Universidade Federal do Cariri-UFCA .

<https://lattes.cnpq.br/7115185393957046>

Nélio Barreto Vieira⁶;

Departamento de Medicina, Universidade Federal do Cariri-UFCA.

<http://lattes.cnpq.br/1710661429430020>

Márcio Fernando Gonçalves Araújo⁷;

Departamento de Medicina, Faculdade de Medicina de Juazeiro do Norte – FMJ.

<http://lattes.cnpq.br/3445395776092381>

Cícera Georgia Brito Milfont⁸;

Departamento de Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<https://lattes.cnpq.br/2225471586878849>

Isabel Sousa Alcântara⁹;

Departamento de Química-Biológica, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<http://lattes.cnpq.br/6642398364012152>

Wellington Soares Feitosa¹⁰;

Universidade Regional do Cariri-URCA.

<http://lattes.cnpq.br/2180008707421103>

Luís Pereira-de-Morais¹¹;

Departamento de Enfermagem, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<https://lattes.cnpq.br/3425970032144286>

Cícera Datiane de Moraes Oliveira Tintino¹².

Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Regional do Cariri-URCA.

<https://lattes.cnpq.br/0055673963995814>

RESUMO: A resistência antimicrobiana em *Klebsiella pneumoniae* é uma das principais barreiras terapêuticas no tratamento de infecções hospitalares. Nesse contexto, moléculas de origem natural têm atraído interesse como moduladores da atividade antibiótica. O isoeugenol, um derivado fenólico estruturalmente associado ao eugenol, exibe propriedades antimicrobianas e capacidade de interagir com membranas lipídicas, embora seus efeitos sobre Gram-negativas ainda sejam pouco definidos. O potencial modulador do isoeugenol foi avaliado pelo método de microdiluição em caldo, comparando-se as CIMs dos antibióticos gentamicina, norfloxacino, ceftazidima e polimixina B isolados e combinados ao terpeno. As análises foram conduzidas em microplacas de 96 poços com incubação padronizada e suspensão bacteriana ajustada à escala 0,5 de McFarland. O isoeugenol apresentou modulação intermediária da ação antibiótica. Os resultados mostraram redução da CIM de ceftazidima e discreta alteração para norfloxacino, enquanto gentamicina e polimixina B permaneceram inalteradas. Esses achados indicam que o isoeugenol exerce interação moderada com a membrana externa da bactéria, porém sem atingir o mesmo impacto observado para outros terpenos mais lipofílicos ou estruturalmente adaptados para atravessar o LPS. Embora apresente atividade moduladora limitada, o isoeugenol demonstrou capacidade de reduzir a CIM de ceftazidima, sugerindo algum nível de interação com mecanismos de permeabilidade ou estabilidade da membrana. Apesar do efeito modesto, o composto permanece relevante como base para futuras otimizações estruturais ou formulações que potencializem sua ação contra bactérias Gram-negativas.

PALAVRAS-CHAVE: Resistência bacteriana. Terpenos. Isoeugenol. Modulação de antibióticos.

ANTIMICROBIAL POTENTIAL OF ISOEUGENOL AGAINST KLEBSIELLA PNEUMONIAE

ABSTRACT: Antimicrobial resistance in *Klebsiella pneumoniae* is one of the main therapeutic barriers in the treatment of hospital-acquired infections. In this context, molecules of natural origin have attracted interest as modulators of antibiotic activity. Isoeugenol, a phenolic derivative structurally associated with eugenol, exhibits antimicrobial properties and the ability to interact with lipid membranes, although its effects on Gram-negative bacteria are still poorly defined. The modulating potential of isoeugenol was evaluated by the broth microdilution method, comparing the MICs of the antibiotics gentamicin, norfloxacin, ceftazidime, and polymyxin B, isolated and combined with the terpene. The analyses were conducted in 96-well microplates with standardized incubation and bacterial suspension adjusted to the 0.5 McFarland scale. Isoeugenol showed intermediate modulation of antibiotic action. The results showed a reduction in the MIC of ceftazidime and a slight alteration for norfloxacin, while gentamicin and polymyxin B remained unchanged. These findings indicate that isoeugenol exerts a moderate interaction with the outer membrane of the bacteria, but without reaching the same impact observed for other more lipophilic terpenes or those structurally adapted to cross LPS. Although it presents limited modulating activity, isoeugenol demonstrated the ability to reduce the MIC of ceftazidime, suggesting some level of interaction with membrane permeability or stability mechanisms. Despite the modest effect, the compound remains relevant as a basis for future structural optimizations or formulations that enhance its action against Gram-negative bacteria.

KEY-WORDS: Bacterial resistance. Terpenes. Isoeugenol. Antibiotic modulation.

INTRODUÇÃO

A resistência bacteriana tem se consolidado como um dos maiores desafios globais em saúde pública, comprometendo a eficácia de antibióticos convencionais e aumentando a incidência de infecções persistentes e de difícil tratamento. O uso inadequado desses fármacos favorece a seleção de microrganismos resistentes, que passam a expressar mecanismos refinados como produção de enzimas inativadoras, alterações de permeabilidade, bombas de efluxo e modificações no alvo terapêutico (Munita & Arias, 2016). Esse cenário ressalta a necessidade de estratégias terapêuticas alternativas capazes de restaurar ou potencializar a atividade antimicrobiana.

Dentro desse contexto, *Klebsiella pneumoniae* destaca-se pela sua elevada importância clínica, sobretudo por sua capacidade de adquirir plasmídeos portadores de genes de β -lactamases de espectro estendido e carbapenemases (Navon-Venezia et al., 2017). Além disso, sua cápsula espessa, o sistema de sideróforos e a habilidade de formar biofilmes favorecem a persistência e a virulência do patógeno, tornando-o um dos principais

agentes etiológicos de infecções hospitalares graves.

Diante da crescente resistência, compostos naturais têm sido intensamente investigados como alternativas terapêuticas promissoras. Entre eles, fenóis derivados de plantas, como o isoeugenol, apresentam especial relevância devido a sua capacidade de interagir com a membrana bacteriana, causando aumento de permeabilidade, desestabilização estrutural e modulação de processos fisiológicos essenciais (Burt, 2004; Chouhan et al., 2017). O isoeugenol, isômero estrutural do eugenol, possui reconhecida atividade antioxidante, anti-inflamatória e antimicrobiana. Sua lipofilicidade permite inserção eficiente na bicamada lipídica, provocando desorganização e efeitos cumulativos sobre a integridade celular.

Estudos recentes destacam que compostos fenólicos como o isoeugenol podem apresentar efeito sinérgico quando combinados com antibióticos, favorecendo o aumento da permeabilidade, o comprometimento da membrana e a interferência em processos metabólicos essenciais da bactéria (Marchese et al., 2017). Assim, sua investigação frente a *K. pneumoniae* representa uma abordagem relevante para o desenvolvimento de adjuvantes terapêuticos, especialmente em infecções causadas por cepas resistentes.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais

Os antibióticos, o isoeugenol e a resazurina foram adquiridos na Sigma Aldrich, todos foram diluídos em DMSO e completados com água destilada estéril até a concentração final de 1024 µg/mL.

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por meio do teste de Concentração Inibitória Mínima (CIM). A cepa bacteriana utilizada, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603, foi previamente cultivada em meio Brain Heart Infusion (BHI) ágar, em incubadora bacteriológica a 37 °C por 24 horas. Em seguida, prepararam-se tubos Eppendorf® contendo 900 µL de BHI 10% e 100 µL da suspensão bacteriana, previamente diluída em solução salina até alcançar uma concentração de aproximadamente 10⁵ UFC/mL.

As microplacas de 96 poços foram preenchidas numericamente, adicionando-se 100 µL desta suspensão bacteriana em cada poço. Posteriormente, foi realizada microdiluição seriada com uma solução do isoeugenol, em concentrações variando de 512 a 8 µg/mL. As placas foram incubadas a 35 °C por 24 horas, e a determinação da CIM foi efetuada utilizando resazurina como indicador. A CIM foi definida como a menor concentração do

extrato na qual não se observou crescimento bacteriano visível, conforme descrito por Coutinho et al. (2008) e Javadpour et al. (1996). Todos os ensaios foram conduzidos em triplicata ($n = 3$).

Atividade modificadora da ação dos antibióticos

A avaliação da atividade potencializadora de antibióticos foi conduzida com a combinação do isoeugenol com os antibióticos gentamicina, polimixina-B, norfloxacino e ceftazidima, que também foram testados individualmente. A cepa bacteriana utilizada, foi *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603

A metodologia proposta por Coutinho et al. (2008) foi utilizada para avaliar o potencial modificador da resistência bacteriana a antibióticos exercido pelo isoeugenol. A solução foi diluída até uma concentração subinibitória (MIC/8). O meio foi preparado em tubos Eppendorf® contendo BHI (10%) + 150 μL da suspensão bacteriana + 188 μL de α -pineno, totalizando 1,5 mL de solução. Para o controle, a solução de 1,35 mL continha apenas BHI (10%) + 150 μL da suspensão microbiana. A placa de microdiluição foi preenchida em ordem alfabética, adicionando-se 100 μL da solução de distribuição a cada poço. Em seguida, realizou-se microdiluição seriada (proporção 1:1) com 100 μL do antibiótico (1024 $\mu\text{g/mL}$), até o penúltimo poço. As placas foram então incubadas a 37 °C por 24 horas. As concentrações do antibiótico variaram gradualmente de 512 a 1 $\mu\text{g/mL}$. A leitura foi realizada da mesma forma que o teste de CIM (Concentração Inibitória Mínima).

Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram expressos como média geométrica $\pm$ desvio padrão da média ($\pm$ SED), avaliados estatisticamente por análise de variância (two-way ANOVA) seguida de pós-teste de Bonferroni utilizando o software *GraphPad Prism 8.3*. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados referentes ao isoeugenol revelaram um perfil modulador particularmente interessante, demonstrando efeitos significativos sobre a susceptibilidade de *Klebsiella pneumoniae* a diferentes antibióticos. A maior redução observada ocorreu para a gentamicina, cuja MIC passou de 50,79 $\mu\text{g/mL}$ para 12,69 $\mu\text{g/mL}$, indicando um efeito sinérgico robusto. Os resultados demonstraram que o isoeugenol promove modulação relevante da atividade antimicrobiana de diferentes antibióticos frente a *Klebsiella pneumoniae*, com efeitos que variam conforme o mecanismo de ação do fármaco. Para gentamicina, a combinação resultou em redução significativa da CIM, indicando que o isoeugenol pode facilitar o acesso do antibiótico ao citoplasma bacteriano. Fenóis lipofílicos

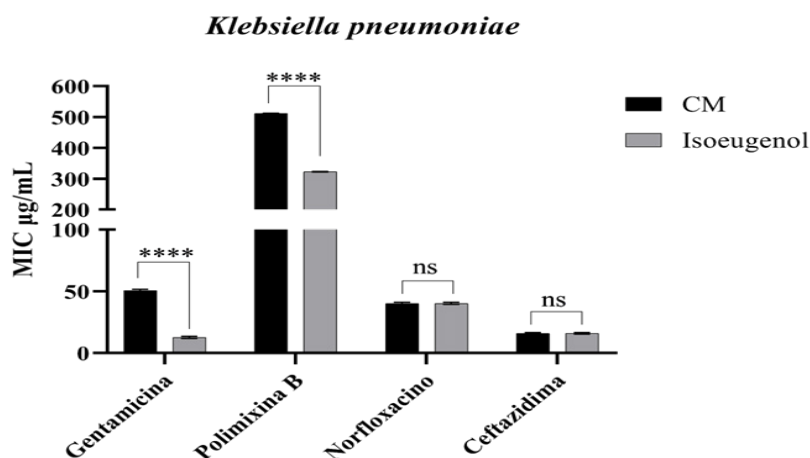
são conhecidos por interagir com membranas e promover desestabilização estrutural, efeito amplamente descrito na literatura (Hyldgaard et al., 2012; Marchese et al., 2017).

No caso da polimixina B, a MIC reduziu-se de 512 µg/mL para 322,53 µg/mL. Embora menos acentuada que a modulação observada para a gentamicina, essa redução indica que o isoeugenol atua de maneira complementar ao mecanismo da polimixina, que já envolve a interação com o LPS. Por possuir alta afinidade lipofílica e propriedades de solvatação da membrana, o isoeugenol pode intensificar a desorganização da bicamada e facilitar o deslocamento de íons essenciais, contribuindo para o dano celular. Isso é coerente com estudos que demonstram que fenóis interferem na estabilidade da bicamada lipídica, promovendo aumento de permeabilidade e desestruturação do envelope celular bacteriano (Chouhan et al., 2017).

Para o norfloxacino, a MIC diminuiu de 40,31 µg/mL para 32 µg/mL, indicando uma modulação positiva moderada. Dado que o norfloxacino depende de entrada via porinas, o isoeugenol pode estar facilitando essa passagem ao reduzir o empacotamento lipídico ao redor dessas estruturas, mantendo, porém, uma organização suficiente para preservar a funcionalidade das proteínas de membrana. Esse equilíbrio entre perturbação e preservação pode resultar em aumento da permeabilidade sem comprometimento estrutural extremo, o que explica a sinergia leve. Além disso, fenóis como o isoeugenol podem gerar estresse oxidativo moderado, que tende a sensibilizar a célula para antibióticos que atuam em processos intracelulares.

O efeito mais discreto foi observado para a ceftazidima, cuja MIC permaneceu inalterada (16 µg/mL). Isso sugere que, embora o isoeugenol comprometa a membrana, ele talvez não interfira de maneira eficaz nos fatores envolvidos na resistência intrínseca aos β-lactâmicos, como a barreira periplasmática e a presença de β-lactamases. Alguns estudos indicam que fenóis volumosos podem até interferir negativamente com certas rotas de acesso periplasmático (Marchese et al., 2017), o que poderia neutralizar parte do efeito benéfico da permeabilização.

Figura 1: Gráfico mostrando as concentrações de antibióticos combinados com isoeugenol contra *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603; valores de MIC ($\mu\text{g/mL}$); “****” $p < 0,0001$ indica diferenças significativas entre os grupos. A significância estatística foi determinada por ANOVA de duas vias e teste post-hoc de Bonferroni.



Considerando a magnitude dos efeitos observados, o isoeugenol se destaca como modulador potente, especialmente em combinação com gentamicina, apresentando o melhor resultado entre os antibióticos testados. Sua capacidade de alterar propriedades físico-químicas da membrana e de induzir estresse metabólico coloca esse composto como um candidato promissor para estudos futuros envolvendo combinação com antimicrobianos.

CONCLUSÃO

O isoeugenol mostrou um comportamento intermediário entre os demais terpenos, com modulação limitada, porém perceptível, da atividade antibiótica contra *Klebsiella pneumoniae*. A redução observada na CIM da ceftazidima e a alteração pouco expressiva para norfloxacin indicam que o isoeugenol exerce alguma interação com estruturas de membrana e processos de permeabilidade, embora em menor magnitude do que o α -pineno. Esses resultados estão alinhados à literatura que descreve o isoeugenol como um composto fenólico capaz de interagir com membranas bacterianas, porém mais efetivo contra bactérias Gram-positivas. Em *K. pneumoniae*, cuja membrana externa apresenta elevada rigidez devido à presença de LPS, seu efeito parece limitado. No entanto, a modulação observada reforça seu potencial como molécula-base em estudos futuros, sobretudo aqueles que avaliem mecanismos combinatórios, otimização estrutural ou sistemas de entrega que aumentem sua capacidade de interação com a barreira lipídica característica de bactérias Gram-negativas.

REFERÊNCIAS

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 223–253, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.001>.

org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of essential oils: a review. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, v. 6, n. 11, p. 2797–2818, 2017.

COUTINHO, H. D. M. et al. Enhancement of the antibiotic activity against a multiresistant *Escherichia coli* by *Mentha arvensis* L. and chlorpromazine. *Chemotherapy*, v. 54, p. 328–330, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1159/000151699>.

HYLDGAARD, M. et al. The antimicrobial mechanism of action of eugenol, thymol and carvacrol is independent of the presence of a phenolic hydroxyl group. *Journal of Applied Microbiology*, v. 113, p. 411–421, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05322.x>.

JAVADPOUR, M. M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. *Journal of Medicinal Chemistry*, v. 39, n. 16, p. 3107–3113, 1996. DOI: <https://doi.org/10.1021/jm960196y>.

MARCHESE, A. et al. Antibacterial and antifungal activities of eugenol and isoeugenol: a review. *Molecules*, v. 22, n. 1, p. 1–26, 2017. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules22010001>.

MUNITA, J. M.; ARIAS, C. A. Mechanisms of antibiotic resistance. *Microbiology Spectrum*, v. 4, n. 2, p. 1–37, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015>.

NAVON-VENEZIA, S.; KONDRATYEVA, K.; CARATTOLI, A. *Klebsiella pneumoniae*: a major worldwide source and shuttle for antibiotic resistance. *FEMS Microbiology Reviews*, v. 41, n. 3, p. 252–275, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1093/femsre/fux013>.

VENTOLA, C. L. The antibiotic resistance crisis: part 1: causes and threats. *Pharmacy and Therapeutics*, v. 40, n. 4, p. 277–283, 2015.