

Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) frente a isolados de *Campylobacter jejuni* oriundos da cadeia produtiva de frangos de corte

EMILY MELLO DE SOUZA¹; NATALIE RAUBER KLEINUBING²; GABRIELE BENATTO DELGADO²; ISABELA SCHNEID KRONING²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA²; GRACIELA VOLZ LOPES³

¹Universidade Federal de Pelotas – emilymello034@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – natalierk10@hotmail.com; gabriele_delgado@hotmail.com; isabelaschneid@gmail.com; wladimir.padilha2011@gmail.com

³Universidade Federal de Pelotas – gracielaavlopes@yahoo.com.br

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, *Campylobacter* spp. é uma das principais bactérias causadoras de gastroenterite de origem alimentar em todo o mundo (WHO, 2020), destacando-se *C. jejuni* como responsável por cerca de 90% dos casos de infecção em humanos (SZCZEPANSKA et al., 2015). As aves, especialmente os frangos, são considerados reservatórios primários da bactéria, não apresentando sintomas de infecção por *Campylobacter* spp. (PARK, 2002). Desta forma, a ingestão de carne de frango mal cozida, bem como a contaminação de alimentos consumidos *in natura*, representam a principal fonte de infecção para humanos (WHO, 2020).

A campilobacteriose geralmente apresenta caráter autolimitante, cursando com sintomas como diarreia, febre e dor abdominal (WHO 2020), porém, em alguns pacientes, a doença pode evoluir para uma infecção sistêmica, podendo desencadear a Síndrome de Guillain-Barré, uma neuropatia autoimune que leva à paralisia flácida (HADDEN; GREGSON, 2001). Nestes casos se faz necessária a terapia com agentes antimicrobianos, o que vem se tornando preocupante devido aos crescentes relatos de resistência de *C. jejuni* frente aos principais antimicrobianos de uso clínico (CDC, 2019).

Os óleos essenciais (OE) são misturas complexas de compostos de baixo peso molecular sintetizados por plantas que possuem propriedades antimicrobianas. Em geral, sua atividade antimicrobiana está relacionada à interação de alguns metabólitos secundários presentes nos óleos essenciais com a estrutura celular bacteriana (NAZZARO et al. 2013). Os metabólitos presentes nos óleos essenciais incluem principalmente terpenos, terpenóides, fenilpropanóides, aldeídos, ésteres, álcoois e cetonas, cuja bioatividade varia dependendo da configuração estrutural da molécula (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; TOHIDI et al., 2019).

O alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é uma planta da família *Lamiaceae* amplamente utilizada como condimento em inúmeros alimentos. O OE de alecrim possui ação anti-inflamatória, hepatoprotetora (RAŠKOVIĆ et al., 2014), além de ação antimicrobiana (LORENZO-LEAL et al., 2019), conferida principalmente por seus compostos majoritários: eucaliptol, α -pineno e cânfora (JIANG et al., 2011). Até o momento, poucos estudos acerca do potencial antimicrobiano do OE de alecrim frente a *C. jejuni* estão disponíveis na literatura (THANISSERY et al., 2014).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* frente a isolados de *C. jejuni* provenientes da cadeia produtiva de frangos de corte.

2. METODOLOGIA

Foram analisados quatro isolados de *C. jejuni* provenientes de granja de frangos de corte, abatedouro de frangos e cortes de frango resfriados comercializados na região sul do Rio Grande do Sul. A atividade antimicrobiana do OE de alecrim foi avaliada qualitativamente pela técnica de disco-difusão em ágar (EUCAST, 2021) e quantitativamente pela técnica de diluição em caldo, para a concentração inibitória mínima (CIM) (KOVÁCS et al., 2016).

O inóculo bacteriano foi preparado a partir de colônias de *C. jejuni* selecionadas de um cultivo de 24 h em ágar Columbia (Neogen®), acrescido de 5 % de sangue equino lisado e desfibrinado, e suspensas em solução salina 0,85% (Synth®), padronizado de acordo com a escala 0,5 de McFarland. Para a técnica de disco-difusão em ágar, o inóculo foi espalhado com auxílio de um swab esterilizado em placas de ágar Mueller Hinton (Kasvi®) acrescido de 5% de sangue equino lisado e desfibrinado. No centro da placa, depositou-se um disco de papel filtro onde 10 µL do OE de alecrim foi disposto. As placas foram incubadas em ambiente de microaerofilia (5% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂) a 42 °C. Após 24 h, os halos de inibição foram medidos e o resultado expresso em milímetros (mm).

A técnica de diluição em caldo, para avaliação da CIM, foi realizada de acordo com KOVÁCS et al. (2016), em placas com 24 cavidades, onde foram adicionados 500 µL de caldo nutriente nº 2 (CN2; Neogen®) com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO; Synth®), 500 µL do OE de alecrim em diferentes concentrações e 500 µL do inóculo bacteriano. Como controle positivo, utilizou-se 500 µL de CN2 + 10% DMSO e 500 µL de inóculo bacteriano. Já como controle negativo, 1000 µL de CN2 + 10% de DMSO foram utilizados. As placas foram incubadas a 42 °C em ambiente de microaerofilia por 24 h. Após esse período, a CIM foi definida como a menor concentração do OE de alecrim, capaz de inibir visivelmente a multiplicação bacteriana (KOVÁCS et al., 2016).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os isolados de *C. jejuni* (n=4) avaliados, apresentaram suscetibilidade ao OE de alecrim (Tabela 1). Os halos de inibição obtidos nesse estudo variaram de 20 a 22,5 mm. Segundo Rota et al. (2008), a atividade dos EOs pode ser classificada como fortemente inibitória quando as zonas de inibição são maiores que 20 mm; moderadamente inibitória, com zonas inibitórias estão entre 12 e 20 mm e sem efeito inibitório quando as zonas inibitórias são menores do que 12 mm. Portanto, o OE de alecrim pode ser considerado com forte atividade inibitória para os isolados A, B e D, já para o isolado C foi obtida uma atividade moderada.

Poucos estudos estão disponíveis sobre o potencial antimicrobiano do OE de alecrim frente a *Campylobacter* spp. (EL BAABOUA et al., 2022; THANISSERY et al., 2014; SMITH-PALMER et al., 1998). Ao avaliar a atividade antimicrobiana do OE de alecrim, THANISSERY et al. (2014) encontraram halos de inibição de 15 e 17 mm, menores do que os encontrados em nosso estudo. EL BAABOUA et al. (2022) encontraram resultados variados (halos de inibição variando entre ≤ 12 mm a 70 mm) ao avaliarem a ação antimicrobiana do OE de alecrim frente a *C. jejuni* com perfil de multirresistência a antimicrobianos e isolados de ambiente e alimentos.

Tabela 1 - Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* frente a isolados de *Campylobacter jejuni*.

Isolados de <i>C. jejuni</i>		Atividade antimicrobiana	
Identificação	Origem	DD (mm)	CIM (mg.mL ⁻¹)
A	Varejo - carcaça de frango	22,5	3,59 (0,4%)
B	Varejo - coxa de frango	21	3,59 (0,4%)
C	Abatedouro – swab de cloaca	20	1,79 (0,2%)
D	Granja – swab de cloaca	22	1,79 (0,2%)

DD: disco-difusão em ágar; CIM: concentração inibitória mínima; mm: milímetros; mg: miligramas; mL: mililitros.

A CIM no presente estudo variou entre 3,59 mg.mL⁻¹ (0,4%) a 1,79 mg.mL⁻¹ (0,2%). Resultados obtidos por EL BAABOUA et al. (2022) demonstraram uma variação isolado-dependente em relação a atividade do OE de alecrim frente a isolados multirresistentes de *C. jejuni*, com CIM variando entre 0,25 e 2,0%, assim, demonstrando a susceptibilidade de isolados de *C. jejuni* multirresistentes ao OE avaliado. Um maior valor de CIM foi observado por SMITH-PALMER et al. (1998), onde o crescimento visível de *C. jejuni* foi inibido por 0,5% de OE de alecrim.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, a resistência aos antimicrobianos é um dos principais problemas de saúde pública no mundo (WHO, 2022). Em *Campylobacter* spp. a resistência a antimicrobianos é considerada de nível sério (CDC, 2019), sendo necessária a pesquisa de substâncias alternativas aos antimicrobianos (WHO, 2022), como o OE de alecrim, que demonstrou ter atividade antimicrobiana frente a *C. jejuni*.

4. CONCLUSÕES

O óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) apresentou ação antimicrobiana frente aos isolados de *C. jejuni* avaliados. Foi possível inibir o crescimento de *C. jejuni* utilizando-se baixas concentrações do OE de alecrim e a concentração inibitória mínima variou de acordo com o isolado testado.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. **Antibiotic resistance threats in the United States, 2019.**, 2019. Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>. Acesso em: 18 set. 2023.
- EL BAABOUA, A., EL MAADOUDI, M., BOUYAHYA, A., BELMEHDI, O., KOUNNOUN, A., CHEYADMI, S., OUZAKAR, S., SENHAJI, N. S., ABRINI, J. Evaluation of the combined effect of antibiotics and essential oils against *Campylobacter* multidrug resistant strains and their biofilm formation. **South African Journal of Botany**, v. 150, 451–465, 2022.
- EUCAST, EUROPEAN COMMITTEE ON ANTIMICROBIAL SUSCEPTIBILITY TESTING. Antimicrobial susceptibility testing EUCAST disk diffusion method, 2023.
- HADDEN, R. D. M., GREGSON, N. A. Guillain-Barre syndrome and *Campylobacter jejuni* infection. **Journal of Applied Microbiology**, v.90, n.30, p. 145-154, 2001.

- JIANG, Y.; WU, N.; FU, Y.-J.; WANG, W.; LUO, M.; ZHAO, C.-J.; ZU, Y.-G.; LIU, X.-L. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, n. 1, p. 63–68, 2011.
- LORENZO-LEAL, A. C.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A.; BACH, H. Antimicrobial, Cytotoxic, and Anti-Inflammatory Activities of *Pimenta dioica* and *Rosmarinus officinalis* Essential Oils. **BioMed Research International**, v. 2019, p. 1–8, 2019.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of Essential Oils on Pathogenic Bacteria. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 1451–1474, 2013. Disponível em: <http://www.mdpi.com/1424-8247/6/12/1451>. Acesso em: 18 set. 2023.
- PARK, S. F. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 177–188, 2002.
- RAŠKOVIĆ, A.; MILANOVIĆ, I.; PAVLOVIĆ, N.; ĆEBOVIĆ, T.; VUKMIROVIĆ, S.; MIKOV, M. Antioxidant activity of rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil and its hepatoprotective potential. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 14, n. 1, p. 225, 2014.
- RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 62, p. 250–264, 2014.
- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 118–122, 1998.
- SZCZEPANSKA, B.; KAMINSKI, P.; ANDRZEJEWSKA, M.; SPICA, D.; KARTANAS, E.; ULRICH, W. Prevalence, virulence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in White stork *Ciconia ciconia* in Poland. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 12, p. 24–31, 2015.
- THANISSERY, R.; KATHARIOU, S.; SMITH, D. P. Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit *Salmonella* and *Campylobacter in vitro*. **Journal of Applied Poultry Research**, v.23, p. 221–227, 2014.
- TOHIDI, B.; RAHIMMALEK, M.; ARZANI, A.; TRINDADE, H. Sequencing and variation of terpene synthase gene (TPS2) as the major gene in biosynthesis of thymol in different *Thymus* species. **Phytochemistry**, v. 169, p. 112126, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2019.112126>.
- travel/campylobacteriosis>. Acesso em: 04 set. 2023.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Campylobacter**. 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/campylobacter>. Acesso em: 05 set. 2023.
- WHO, World Health Organization. **Antibacterial agents in clinical and preclinical development: An overview and analysis**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/publications/i/item/9789240047655>. Acesso em: 18 set. 2023.