

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Minthostachys setosa* (MUÑA) CONTRA ISOLADOS DE *Campylobacter jejuni*

GIOVANA WINK FALEIRO¹; NATALIE RAUBER KLEINUBING², PAMELA INCHAUSPE CÔRREA ALVES², TASSIANA RAMIRES², GRACIELA VÖLZ LOPES²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – giovanawink@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – nataliek10@hotmail.com;

²Universidade Federal de Pelotas – pam.inchauspe@hotmail.com;

²Universidade Federal de Pelotas – tassianaramires@gmail.com;

²Universidade Federal de Pelotas – gracielvlopes@yahoo.com.br

³Universidade Federal de Pelotas – wladimir.padilha2011@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

Campylobacter jejuni é uma bactéria Gram-negativa, que apresenta morfologia típica de bastonetes curtos, em formato de espiral, com um flagelo polar (COHEN, 2021). O micro-organismo pode infectar muitos animais, sendo frangos de corte os principais reservatórios. A transmissão horizontal pelo ambiente onde esses animais vivem é considerada a fonte primária de *C. jejuni*, sendo que a porção cecal de frangos apresenta carga elevada do patógeno. Assim, falhas nos procedimentos de abate e a incorreta manipulação da carcaça dos frangos em abatedouros-frigoríficos pode propiciar a contaminação cruzada devido ao extravasamento de conteúdo gastrointestinal (KOZU, 2021).

O consumo de alimentos e água contaminados por esse patógeno é responsável por causar campilobacteriose em humanos, uma doença zoonótica distribuída mundialmente, que apresenta sintomatologia similar a outras gastroenterites e normalmente autolimitante (LOPES, 2021). Complicações pós-infecções sistêmicas, associadas a *C. jejuni*, incluem neuropatia desmielinizante grave, como a síndrome de Guillain-Barré, distúrbio autoimune que manifesta paralisia muscular (IGWARAN, 2019). Em casos graves, a terapia com antimicrobianos pode ser necessária para combater a infecção. No entanto, com a crescente ocorrência de resistência a esses fármacos, têm-se buscado alternativas naturais e seguras para o controle de patógenos bacterianos (CDC, 2019).

Como alternativa ao uso de antimicrobianos, os óleos essenciais vêm ganhando destaque, pois possuem potencial para auxiliar no combate à resistência bacteriana, uma vez que são compostos naturais, bioativos e eficazes frente a diferentes patógenos de origem alimentar (ALMEIDA, 2020). Nessa perspectiva, destaca-se a muña (*Minthostachys setosa*), planta arbustiva cultivada em países andinos, que tem sido tradicionalmente utilizada como conservante de alimentos, anti-inflamatório e antimicrobiano, devido aos terpenos presentes em sua composição (WORLD OF PERUVIAN HERBS, 2023; PERALTA-CANCHIS, 2020). Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Minthostachys setosa* (OEMS) contra isolados de *C. jejuni* oriundos da cadeia produtiva de frango de corte.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados quatro isolados de *C. jejuni* provenientes da cadeia de produção avícola, previamente caracterizados por KLEINUBING et al. (2021),

quanto ao seu perfil de resistência antimicrobiana. As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas/RS.

A avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana do OEMS (Pukllay Herbolaria) foi realizada pela técnica de disco-difusão em ágar, de acordo com a EUCAST (2021). A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada pela técnica de diluição em caldo, seguindo protocolo descrito por KOVÁCS et al. (2016), com algumas modificações. Os isolados de *C. jejuni* foram cultivados em ágar Columbia (AC, Neogen®), acrescido de 5% de sangue equino desfibrinado e lisado, por 24 h a 42 °C, sob condições de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂). O inóculo foi preparado a partir dessa cultura em solução salina 0,85% (Synth®), até a turbidez 0,5 da escala de McFarland (~10⁸ UFC.mL⁻¹), sendo avaliada em espectrofotômetro (DO₆₀₀ = 0,1). O inóculo bacteriano foi espalhado uniformemente sob a superfície da placa de Petri contendo ágar Mueller Hinton (MH, Kasvi®) com 5% de sangue equino lisado e desfibrinado e 10 µL de óleo essencial disposto sobre disco de papel de 6 mm (Laborclin®) no centro da placa, a qual foi incubada sob condições de microaerofilia a 42 °C por 24 h. Após o período de incubação, o halo de inibição foi medido e o resultado expresso em milímetros.

Para a obtenção da CIM, o inóculo bacteriano foi semeado em AC (Neogen®) por 24 h e uma solução foi ajustada até a turbidez 0,5 da escala de McFarland (~1,5x10⁸ UFC.mL⁻¹). Posteriormente, foram realizadas diluições decimais seriadas do OEMS em caldo Nutriente nº 2 (CN2, Kasvi®), com 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Synth®), em placa de cultura de 24 cavidades, contendo 500 µL de CN2. Após a diluição, 500 µL do inóculo bacteriano foram adicionados em cada um dos poços contendo 500 µL de CN2 e 10% de DMSO. Em seguida, a microplaca foi incubada em condições de microaerofilia, por 24 h a 42 °C. A CIM foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir a multiplicação de *C. jejuni* (KOVÁCS et al., 2016).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados de *C. jejuni* apresentaram suscetibilidade ao OEMS, uma vez que foram obtidas zonas de inibição variando entre 75 e 84 mm (Tabela 1). De acordo com ROTA et al. (2008), a atividade dos óleos essenciais pode ser classificada como fortemente inibitória quando as zonas de inibição são superiores a 20 mm. A avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana do OEMS foi realizada através do teste de diluição em caldo, para obtenção da CIM. Os valores da CIM encontrados no presente estudo (Tabela 1) demonstram que o óleo essencial avaliado é capaz de inibir a multiplicação bacteriana.

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Minthostachys setosa* (muña) contra isolados de *Campylobacter jejuni*

	ID dos isolados de <i>C. jejuni</i>			
	6	20	24	28
DD (mm)	84	75	80	82,5
CIM (mg.mL ⁻¹)	3,6 (0,4%)	3,62 (0,4%)	1,8 (0,2%)	1,8 (0,2%)

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

Minthostachys setosa pertence à família *Lamiaceae*, assim como *Mentha longifolia* (hortelã-silvestre) e ambas possuem em sua composição, como composto majoritário, a pulegona, responsável pela maioria dos efeitos farmacológicos destas plantas (PERALTA-CANCHIS, 2021; MIKAILI, 2013). Atualmente, não há dados disponíveis sobre a atividade de *M. setosa* sobre *C. jejuni*. Porém, estudo conduzido por SHARMA et al. (2020), com *M. longifolia* sobre isolados de *Escherichia coli*, outro patógeno de origem alimentar e também Gram-negativo, demonstrou uma CIM de 2 mg.mL⁻¹, valor semelhante ao obtido neste estudo. Por outro lado, PERALTA-CANCHIS (2021), avaliou 13 isolados de *Staphylococcus aureus*, um patógeno Gram-positivo, e encontrou valores de CIM de 120 mg.mL⁻¹, concentrações superiores às observadas no presente estudo. Segundo MENEZES et al. (2009), os óleos essenciais apresentam boa atividade antimicrobiana quando sua CIM é inferior a 100 mg.mL⁻¹, corroborando a eficácia do OEMS frente aos isolados de *C. jejuni* avaliados no presente estudo (Tabela 1).

A resistência a antimicrobianos é considerada uma ameaça à saúde pública global, uma vez que estudos estimam que 4,95 milhões de mortes foram associadas à resistência bacteriana em 2019 (WHO, 2023). Nas últimas décadas, *C. jejuni* adquiriu resistência a antimicrobianos importantes na terapêutica da campilobacteriose, comprometendo a eficácia do tratamento da doença, quando necessária a antibioticoterapia. Estudos recentes demonstram resistência a diversos antimicrobianos, dentre eles à ciprofloxacina, apresentando 89,2% de resistência (BUIATTE, 2023), inviabilizando o uso desse fármaco na terapêutica da doença. Assim, com a finalidade de prospectar propriedades antimicrobianas em recursos naturais, os óleos essenciais se apresentam como uma alternativa, devido ao seu potencial antimicrobiano, com compostos capazes de limitar a multiplicação de *C. jejuni*.

4. CONCLUSÕES

Todos os isolados de *C. jejuni* (n=4) avaliados no presente estudo são suscetíveis ao OEMS, tendo esse óleo essencial demonstrado potencial antimicrobiano frente a esse patógeno. Esse resultado é significativo, pois demonstra uma alternativa ao uso de antimicrobianos tradicionais, sendo o OEMS uma possível opção para o controle de *C. jejuni*.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. C.; ALMEIDA, P. P.; GHERARDI, S. R. M. Potencial antimicrobiano de óleos essenciais: uma revisão de literatura de 2005 a 2018. **Nutri-time**, v. 17, p. 8623–8633, 2020.
- BUIATTE, A. B. G.; DE MELO, R. T.; PERES, P. A. B. M.; BASTOS, C. M.; GRAZZIOTIN, A. L.; ARMENDARIS RODRIGUEZ, P. M.; BARRETO, F.; ROSSI, D. A. Virulence, antimicrobial resistance, and dissemination of *Campylobacter coli* isolated from chicken carcasses in Brazil. **Food Control**, v. 147, p. 109613, 2023.
- CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (U.S.). Antibiotic resistance threats in the United States, 2019. [S. l.]: Centers for Disease Control and Prevention (U.S.), 2019. Disponível em: <https://stacks.cdc.gov/view/cdc/82532>. Acesso em: 12 set. 2023.

- COHEN, E. J.; NAKANE, D.; KABATA, Y.; HENDRIXSON, D. R.; NISHIZAKA, T.; BEEBY, M. *Campylobacter jejuni* motility integrates specialized cell shape, flagellar filament, and motor, to coordinate action of its opposed flagella. **PLOS Pathogens**, v. 16, n. 7, 2020.
- GONG, H.; HE, L.; ZHAO, Z.; MAO, X.; ZHANG, C. The specific effect of (R)-(+)-pulegone on growth and biofilm formation in multi-drug resistant *Escherichia coli* and molecular mechanisms underlying the expression of *pgaABCD* genes. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, v. 134, p. 111149, 2021.
- IGWARAN, A.; OKOH, A. I. Human campylobacteriosis: A public health concern of global importance. **Heliyon**, v. 5, n. 11, p. e02814, 2019.
- KOVÁCS, J. K.; FELSŐ, P.; MAKSZIN, L.; PÁPAI, Z.; HORVÁTH, G.; ÁBRAHÁM, H.; PALKOVICS, T.; BÖSZÖRMÉNYI, A.; EMŐDY, L.; SCHNEIDER, G. Antimicrobial and Virulence-Modulating Effects of Clove Essential Oil on the Foodborne Pathogen *Campylobacter jejuni*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 20, p. 6158–6166, 2016.
- LOPES, G.V.; RAMIRES, T.; KLEINUBING, N.R.; SCHEIK, L.K; FIORENTINI, Â.M.; SILVA, W.P. Virulence factors of foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. **Microbial Pathogenesis**, v. 161, p. 105265, dez 2021. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0882401021005398?via%3Dihub>. Acesso em: 13 set. 2023.
- MENEZES, T. O. A.; ALVES, A. C. B. A.; VIEIRA, J. M. S.; MENEZES, A. F.; ALVES, B. P.; MENDONÇA, L. C. V. Avaliação in vitro da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.38, 184-191, 2009.
- MIKAILI, P.; MOJAVERROSTAMI, S.; MOLOUDIZARGARI, M.; AGHAJANSHAKERI, S. Pharmacological and therapeutic effects of *Mentha Longifolia* L. and its main constituent, menthol. **Ancient Science of Life**, v. 33, n. 2, p. 131–138, 2013.
- PERALTA-CANCHIS, L. P. **Caracterização fenotípica e genotípica de isolados de *Staphylococcus aureus* envolvidos em surtos de intoxicação alimentar no Rio Grande do Sul e atividade antimicrobiana e de redução de biofilme de óleos essenciais de *Piper elongatum* (Vahl.) e *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling**. 2021. 107 f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, 2021.
- ROTA, M. C.; HERRERA, A.; MARTÍNEZ, R. M.; SOTOMAYOR, J. A.; JORDÁN, M. J. Antimicrobial activity and chemical composition of *Thymus vulgaris*, *Thymus zygis* and *Thymus hyemalis* essential oils. **Food Control**, v. 19, n. 7, p. 681–687, 2008.
- SHARMA, K.; GULERIA, S.; RAZDAN, V. K.; BABU, V. Synergistic antioxidant and antimicrobial activities of essential oils of some selected medicinal plants in combination and with synthetic compounds. **Industrial Crops and Products**, v. 154, p. 112569, 2020.
- WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Global research agenda for antimicrobial resistance in human health**. 2023.
- WORLD OF PERUVIAN HERBS. Muña. 2023. **World of Peruvian Herbs**. Disponível em: <https://rostlinyperu.cz/en>. Acesso em: 5 set. 2023