

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Piper elongatum* (Vahl) CONTRA ISOLADOS DE *Campylobacter jejuni* RESISTENTES A ANTIMICROBIANOS

NATALIE RAUBER KLEINÜBING¹; PÂMELA INCHAUSPE CORRÊA ALVES²;
TASSIANA RAMIRES²; ISABELA SCHNEID KRÖNING²; GRACIELA VOLZ
LOPES²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – natalierk10@hotmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – pam.inchauspe@hotmail.com; tassianaramires@gmail.com;
isabelaschneid@gmail.com; gracielavlopes@yahoo.com.br

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

1. INTRODUÇÃO

A campilobacteriose, doença diarreica aguda causada por bactérias do gênero *Campylobacter*, é a principal doença zoonótica reportada em países desenvolvidos (WHO, 2020). As espécies termofílicas, como *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* são as principais responsáveis pelos casos da doença, veiculadas principalmente pela carne de aves, especialmente frango, contaminada com o patógeno. Além disso, a contaminação cruzada a partir da manipulação do alimento contaminado facilita e propicia a disseminação de *Campylobacter* termofílicos (WHO, 2020).

Em humanos, a campilobacteriose possui um período de incubação variando entre um e 10 dias, cursando com sintomas como diarreia, fortes dores abdominais, febre, dores de cabeça, náusea e vômito. Apesar de ser habitualmente uma doença autolimitante, em alguns casos é necessária a terapia de suporte aos sintomas, incluindo a terapia antimicrobiana (CDC, 2021), o que se torna preocupante devido aos relatos de resistência do patógeno aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento (CDC, 2021; WIECZOREK; OSEK, 2017).

A resistência a antimicrobianos é considerada pela Organização Mundial da Saúde como uma das dez principais ameaças globais à saúde pública enfrentadas pela humanidade, sendo necessárias medidas multissetoriais urgentes para mitigar essa ameaça (WHO, 2021). Neste sentido, a busca por substâncias com potencial antimicrobiano é relevante e de grande importância, tendo os óleos essenciais (OEs) destaque por seu potencial antimicrobiano contra diversos patógenos (LASTRA-VARGAS et al., 2023).

O matico (*Piper elongatum* (Vahl)) é uma árvore que pertence à família *Piperaceae*, e pode alcançar 2 a 3 metros de altura. Nativo de regiões de floresta do Peru e Bolívia, essa planta é utilizada tradicionalmente por suas propriedades terapêuticas. Estudos apontam que o OE de *P. elongatum* (Vahl) possui ação antioxidante, além de ter demonstrado atividade antimicrobiana frente a *Staphylococcus aureus* (PERALTA-CANCHIS, 2021). Frente ao exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Piper elongatum* (Vahl) (OEPE) contra isolados de *C. jejuni* resistentes e multirresistentes a antimicrobianos provenientes da cadeia produtiva de frangos de corte.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados quatro isolados de *C. jejuni* com perfil de resistência a antimicrobianos, previamente identificados e provenientes de diferentes pontos da cadeia produtiva de frangos de corte (granja, abatedouro e cortes comerciais). Para avaliar o potencial antimicrobiano do OEPE (Pukllay Herbolaria EIRL) frente a *C. jejuni* foram realizados os testes de disco-difusão em ágar e diluição em caldo. O inóculo para os testes foi preparado em solução salina 0,85% (Synth®) a partir de um cultivo de 24 h em ágar Columbia (AC) (Neogen), adicionado de sangue equino lisado e desfibrinado, padronizado em espectrofotômetro a 0,01 em comprimento de onda de 625 nm. Para a técnica de disco-difusão em ágar o inóculo foi semeado com auxílio de um swab esterilizado, em placas contendo ágar Muller-Hinton (MH, Kasvi®) acrescido de sangue equino lisado e desfibrinado, e em um disco de papel filtro colocado sobre o meio de cultura, adicionou-se 10 µL de OEPE. As placas foram incubadas a 42 °C por 24 h, em ambiente de microaerofilia (5% de O₂ e 10% de CO₂, 85% de N₂). Após o período de incubação, as zonas de inibição foram medidas e o resultado expresso em milímetros (mm) (EUCAST, 2021).

Para a definição da concentração inibitória mínima (CIM) do OEPE por meio da técnica de diluição em caldo, foram utilizadas placas de cultivo celular com 24 cavidades. Em cada cavidade foi adicionado 500 µL de caldo nutriente nº 2 (CN2) (Neogen®), acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (Synth®) e do OE em diferentes concentrações. Em seguida, adicionou-se 500 µL de inóculo em cada cavidade. Como controle positivo utilizou-se 500 µL de CN2 com 10% de DMSO e 500 µL de inóculo; como controle negativo foi utilizado 1000 µL de CN2 com 10% de DMSO. As placas foram incubadas a 42 °C por 24 h em ambiente de microaerofilia e a CIM foi definida como a menor concentração do OEPE capaz de inibir visivelmente a multiplicação do patógeno. Posteriormente, uma alíquota de cada cavidade da microplaca foi semeada em placas contendo AC, para definição da concentração bactericida mínima (CBM). As placas foram incubadas a 42 °C por 24 h e após esse período a CBM foi definida como a menor concentração do OEPE que inibiu, no mínimo, 99,9% da multiplicação bacteriana (KOVÁCS et al., 2016).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

O OEPE demonstrou atividade antibacteriana contra os isolados de *C. jejuni* resistentes a antimicrobianos (Tabela 1). No teste de disco-difusão em ágar, os diâmetros das zonas de inibição variaram entre 42,5 e 55 mm. De acordo com ROTA et al. (2008), zonas de inibição com diâmetros superiores a 20 mm podem indicar uma forte atividade antimicrobiana do óleo essencial (ROTA et al., 2008).

Tabela 1. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Piper Elongatum* contra isolados de *Campylobacter jejuni*

	Isolados de <i>C. jejuni</i>			
	A	B	C	D
DD (mm)	55	52,5	50	42,5
CIM (mg.mL ⁻¹) (%)	1,22 (0,1%)	0,3 (0,02%)	2,45 (0,2%)	2,45 (0,2%)
CBM (mg.mL ⁻¹) (%)	1,22 (0,1%)	0,3 (0,02%)	2,45 (0,2%)	4,9 (0,4%)

DD: disco-difusão em ágar; mm: milímetros; mg: miligramas; mL: mililitros; v: volume

A CIM e CBM do OEPE também variaram entre os isolados, sendo identificados valores de 0,3 mg.mL⁻¹ a 2,45 mg.mL⁻¹ como CIM, e 0,3 mg.mL⁻¹ a 4,9 mg.mL⁻¹ para CBM. Os isolados apresentaram, em sua maioria, valores semelhantes de CIM e CBM, o que pode demonstrar um potencial bactericida do OEPE (EL BAABOUA et al., 2022).

Não existem dados disponíveis na literatura científica em relação à avaliação da atividade antimicrobiana do OEPE frente a isolados de *C. jejuni*. A atividade antimicrobiana do OEPE em isolados de *S. aureus*, patógeno Gram-positivo, foi avaliada por PERALTA-CANCHIS (2021), onde a CIM e CBM foram de 122,85 mg.mL⁻¹ e 286,67 mg.mL⁻¹, respectivamente. Dados disponíveis na literatura demonstram que bactérias Gram-positivas parecem ser mais suscetíveis aos OEs quando comparadas à Gram-negativas, provavelmente, devido a composição da superfície celular (NAZZARRO et al., 2013), no entanto, neste estudo, *C. jejuni*, uma bactéria Gram-negativa, apresentou valores de CIM e CBM inferiores aos observados para *S. aureus* por PERALTA-CANCHIS (2021).

De acordo com PERALTA-CANCHIS (2021) o OEPE é composto majoritariamente por eucaliptol, composto que teve sua atividade antimicrobiana avaliada por VAZQUEZ et al. (2020) frente a isolados multirresistentes de *E. coli*, um patógeno Gram-negativo, assim como *C. jejuni*, e os autores obtiveram valores de CIM variando entre 0,5% e > 2%, portanto, superiores aos obtidos no presente estudo. O eucaliptol foi avaliado frente a *E. coli* O157:H7 por ADDO et al. (2023), os quais encontraram CIM de 3,2 mg.mL⁻¹. No entanto, estudos reportam que *Campylobacter* spp. podem ser de 5 a 10 vezes mais suscetíveis aos OEs quando comparados com outros patógenos (FRIEDMAN et al., 2002; THANISSERY et al., 2014), provavelmente devido às suas características fastidiosas (THANISSERY et al., 2014). Além disso, a atividade antimicrobiana de um OE pode estar relacionada à interação dos diversos compostos presentes e não somente ao composto majoritário (BASSOLÉ et al., 2012).

4. CONCLUSÕES

O óleo essencial de *Piper elongatum* (Vahl) demonstrou ter atividade antibacteriana contra isolados de *C. jejuni* resistentes a antimicrobianos. Este é o primeiro estudo que avaliou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Piper elongatum* (Vahl) contra *C. jejuni* e mais estudos são necessários para avaliar o potencial desse óleo essencial, quando aplicado em um modelo alimentar ou em embalagem para alimentos.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADDO, K. A.; LI, H.; YU, Y.; XIAO, X. Unraveling the mechanism of the synergistic antimicrobial effect of cineole and carvacrol on *Escherichia coli* O157:H7 inhibition and its application on fresh-cut cucumbers. **Food Control**, v. 144, p. 109339, 2023.
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential Oils in Combination and Their Antimicrobial Properties. *Molecules*, v. 17, n. 4, p. 3989–4006, 2012.
- CDC, CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. *Campylobacter* (Campilobacteriosis). 2021. **Centers for Disease Control and Prevention**. Disponível em: <https://www.cdc.gov/campylobacter/>.
- 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, p. 451–465, 2022.

EUCAST, European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing. Antimicrobial susceptibility testing. **EUCAST disk diffusion method**, v. 11, 2023. Acesso em 10 set. 2023. Disponível em: https://www.eucast.org/fileadmin/src/media/PDFs/EUCAST_files/Disk_test_documents/2023_manuals/Manual_v_11.0_EUCAST_Disk_Test_2023.pdf.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Bactericidal activities of plant essential oils and some of their isolated constituents against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal of Food Protection**, v. 65, p. 1545–1560, 2002.

KOVÁCS, J. K.; FELSO, P.; MAKSZIN, L.; PÁPAI, Z.; HORVÁTH, G.; ÁBRAHÁM, H.; PALKOVICS, T.; BÖSZÖRMÉNYI, A.; EMÓDY, 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.

LASTRA-VARGAS, L.; HERNÁNDEZ-NAVA, R.; RUÍZ-GONZÁLEZ, N.; JIMÉNEZ MUNGUÍA, M. T.; LÓPEZ-MALO, A.; PALOU, E. Oregano essential oil as an alternative antimicrobial for the control of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* in Turkey mortadella during refrigerated storage. **Food Chemistry Advances**, v. 2, p. 1638–1644, 2023.

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.

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, p. 681–687, 2008.

VAZQUEZ, N. M.; MARIANI, F.; TORRES, P. S.; MORENO, S.; GALVÁN, E. M. Cell death and biomass reduction in biofilms of multidrug resistant extended spectrum β -lactamase-producing uropathogenic *Escherichia coli* isolates by 1,8-cineole. **PLOS ONE**, v. 15, 2020.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial Resistance. 2021. **World Health Organization**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/antimicrobial-resistance>.

WHO, WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Campylobacter*. 2020. **World Health Organization**. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/factsheets/detail/campylobacter>.

WIECZOREK, K.; OSEK, J. Antimicrobial Resistance and Genotypes of *Campylobacter jejuni* from Pig and Cattle Carcasses Isolated in Poland During 2009–2016. **Microbial Drug Resistance**, v. 0, n. 0, 2017.