

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE CRAVO (*Syzygium aromaticum*) CONTRA ISOLADOS DE *Campylobacter jejuni* resistentes a antimicrobianos

GIOVANA WINK FALEIRO¹; NATALIE RAUBER KLEINUBING²; ISABELA SCHNEID KRONING²; LUIZ GUSTAVO BACH²; ERIC HIROYOSHI OSSUGUI²; WLADIMIR PADILHA DA SILVA³

¹Universidade Federal de Pelotas – giovanawink@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – natalierk10@hotmail.com; isabelaschneid@gmail.com; lugubach@hotmail.com; eric.ossugui@gmail.com

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

1. INTRODUÇÃO

Campylobacter spp. é um importante patógeno de origem alimentar, responsável por causar uma infecção em humanos, denominada campilobacteriose. Cerca de 90% dos casos de campilobacteriose em humanos são causados por *Campylobacter jejuni* (CDC, 2024), a qual é uma bactéria classificada como termofílica devido a sua temperatura ótima de multiplicação ser em torno de 42 °C (MOORE et al., 2004). Essa particularidade permite que *C. jejuni* se adapte ao trato intestinal de aves, como frangos de corte (ZHANG et al., 2020), que podem apresentar elevada carga do patógeno na porção cecal. Essa característica é relevante principalmente no momento do abate, pois o extravasamento de conteúdo gastrointestinal pode propiciar a contaminação da carcaça (CLARKE et al., 2021).

Alimentos como carne de frango crua ou mal cozida e água não tratada, contaminados com *C. jejuni*, bem como a contaminação cruzada a partir destes, estão relacionados a casos de campilobacteriose em humanos (CDC, 2024). A infecção é caracterizada por gastroenterite autolimitante, na sua forma branda, porém, podem haver complicações como a síndrome de Guillain-Barré (CDC, 2024). Em casos graves, a terapia com antimicrobianos pode ser recomendada, embora sua eficácia seja comprometida pela crescente resistência de *C. jejuni* a essas drogas (DAI et al., 2020), exigindo a busca por alternativas.

Diversos óleos essenciais têm demonstrado potencial de uso contra patógenos de origem alimentar, devido a sua atividade antimicrobiana (MAGGINI, 2024), como *Syzygium aromaticum*, uma árvore nativa da Indonésia, que possui botões aromáticos conhecidos como cravo, o qual tem sido tradicionalmente utilizado como tempero (MBAVENG, 2017). Estudos têm reportado atividade antimicrobiana associada ao composto aromático e volátil encontrado no cravo, o eugenol (MAGGINI, 2017; HARO-GONZÁLEZ, 2021). Diante disso, o objetivo do estudo foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo (OEC) contra isolados de *C. jejuni* provenientes da cadeia produtiva de frangos de corte.

2. METODOLOGIA

Foram utilizados quatro isolados de *C. jejuni* oriundos da cadeia de produção avícola, previamente caracterizados por WÜRFEL et al. (2018), RAMIRES et al. (2020) e KLEINUBING et al. (2021). As análises foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, da Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, da Universidade Federal de Pelotas.

A avaliação qualitativa da atividade antimicrobiana do OEC (*Syzygium aromaticum*) (Lazslo®) foi realizada através do teste de disco-difusão em ágar (DD), de acordo com método descrito por *European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing* (EUCAST) (2024). O inóculo bacteriano foi preparado em solução salina 0,85% (Synth®), até a turbidez 0,5, de acordo com a escala de McFarland ($\sim 1,5 \times 10^8$ UFC.mL⁻¹). Após, o inóculo bacteriano foi espalhado sob a superfície de placas de Petri contendo ágar Mueller Hinton (MH) (Kasvi®), adicionado de 5% de sangue equino lisado e desfibrinado. Sobre discos de papel de 6 mm de diâmetro (Laborclin®) foi adicionado 10 µL do OEC e, após, incubado em condições de microaerofilia (5% O₂, 10% CO₂, 85% N₂) a 42 °C por 24 h. Posteriormente, o diâmetro da zona de inibição foi mensurado, apresentado como média ± desvio padrão e o resultado expresso em milímetros (mm)

Para confirmar e quantificar a atividade antimicrobiana do OEC, a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram obtidas seguindo protocolo de diluição em caldo descrito por KOVÁCKS et al. (2016), com modificações. A avaliação da CIM foi feita a partir de diluições seriadas do OEC em caldo Nutriente nº 2 (CN2, Kasvi®), acrescido de 10% de dimetilsulfóxido (DMSO, Synth®), em placa de cultura de 24 cavidades, contendo 500 µL de CN2. Posterior a diluição, 500 µL do inóculo bacteriano foram adicionados em cada um dos poços contendo 500 µL de CN2 e 10% de DMSO e diferentes concentrações do OEC. 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 OEC capaz de inibir a multiplicação visível de *C. jejuni*. Para determinar a CBM, 10 µL de cada poço sem multiplicação visível de *C. jejuni*, foram semeados em placas de Petri contendo AC, sendo incubados a 42 °C por 48 h sob condições de microaerofilia. A CBM foi definida como a menor concentração capaz de causar 99,9% de morte bacteriana.

A análise da atividade antimicrobiana dos compostos voláteis presentes no OEC foi feita através do teste de fase de vapor (FISCHER;PHILLIPS,2006). O inóculo bacteriano foi espalhado em placas de Petri contendo MH (Kasvi®), adicionado de 5% de sangue equino lisado e desfibrinado. Os discos de papel filtro de 6 mm de diâmetro (Laborclin®) foram colocados na tampa da placa de Petri e, sobre eles, 10 µL do OEC foram adicionados. Após, as placas foram incubadas invertidas em condições de microaerofilia a 42 °C por 48 h. Posteriormente, a avaliação do diâmetro da zona de inibição foi mensurada, os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão, e expressos em milímetros (mm).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Todos os isolados de *C. jejuni* avaliados demonstraram suscetibilidade ao OEC, apresentando zonas de inibição variando entre 45 e 65 mm (Tabela 1). Conforme ROTA et al. (2008), zonas de inibição superiores a 20 mm podem indicar forte atividade antimicrobiana dos OE. A avaliação quantitativa da atividade antimicrobiana do OEC foi realizada através dos testes CIM e CBM, apresentando valores entre 0,15 e 0,59 mg.mL⁻¹. Os resultados semelhantes obtidos, tanto da CIM quanto da CBM indicam que o OEC possui um efeito bactericida, uma vez que a concentração que inibe a multiplicação bacteriana é a mesma capaz de causar a morte do patógeno (EL BAABOUA et al., 2022).

Tabela 1. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo (*Syzygium aromaticum*) contra isolados de *Campylobacter jejuni*

Isolado	DD (mm)	CIM (mg.mL ⁻¹)	CBM (mg.mL ⁻¹)	Fase de vapor (mm)
1	57,5 ± 2,5	0,59 (0,05%)	0,59 (0,05%)	49,0
2	53,5 ± 1,5	0,15 (0,01%)	0,15 (0,01%)	45,5 ± 0,5
3	47,5 ± 2,5	0,59 (0,05%)	0,59 (0,05%)	42 ± ,03
4	57,5 ± 7,5	0,59 (0,05%)	0,59 (0,05%)	46,5 ± 1,5

DD: disco-difusão; CIM: concentração inibitória mínima; CBM: concentração bactericida mínima; mm: milímetros; mg: miligramas

KOVÁCS et al. (2016) também mensuraram a atividade antimicrobiana do OEC sobre isolados de *C. jejuni*, obtendo CIM de 0,02 mg/mL⁻¹ e CBM de 0,08 mg/mL⁻¹, comprovando a eficácia desse OE contra o patógeno. BAI et al. (2023) avaliaram a atividade antimicrobiana do OEC sobre isolados de *Escherichia coli*, outro patógeno de origem alimentar e também Gram-negativo, obtendo CIM de 0,64 e CBM de 1,28 mg/mL⁻¹, valores próximos aos obtidos neste estudo. Diante da crescente ocorrência de resistência a diferentes antimicrobianos de uso clínico, estudos têm evidenciado a atividade de OE contra isolados multirresistentes de *C. jejuni* (KOVÁCS et al., 2016; EL BAABOUA et al., 2022), apresentado uma alternativa no combate ao patógeno.

Os compostos voláteis do OEC demonstraram potencial de inibição bacteriana, com halos de inibição que variaram entre 39 e 49 mm (Tabela 1). Ao aplicar OE sobre uma matriz alimentar, os compostos liberados podem influenciar as características sensoriais do alimento (FISCHER;PHILLIPS, 2006), principalmente quando em contato direto. Assim, a utilização da fase de vapor poderia ser uma alternativa para aplicação do OEC, criando uma microatmosfera capaz de inibir *C. jejuni*, sem alterar as propriedades do alimento.

4. CONCLUSÕES

O OEC avaliado no presente estudo demonstrou atividade antimicrobiana contra isolados de *C. jejuni* provenientes da cadeia produtiva de frangos de corte. Os resultados foram significativos, uma vez que esse óleo essencial pode ser uma alternativa natural e segura para o controle de *C. jejuni* em alimentos. Porém, são necessários mais estudos a fim de avaliar a atividade antimicrobiana do OEC em modelos alimentares.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BAI, J.; LI, J.; CHEN, Z.; BAI, X.; YANG, Z.; WANG, Z.; YANG, Y. Antibacterial activity and mechanism of clove essential oil against foodborne pathogens. **LWT**, v. 173, p. 114249, 2023.

Center for Disease Control and Prevention (CDC). Clinical Overview of *Campylobacter*. Disponível em: <https://www.cdc.gov/campylobacter/hcp/clinical-overview/index.html>. Acesso em: 23 de set. 2024.

- CLARKE, A. K.; AJLOUNI, S. Recommended Practices to Eliminate *Campylobacter* from Live Birds and Chicken Meat in Japan. **Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 57–74, 2021.
- DAI, L.; SAHIN, O.; GROVER, M.; ZHANG, Q. New and alternative strategies for the prevention, control, and treatment of antibiotic-resistant *Campylobacter*. **Translational Research: The Journal of Laboratory and Clinical Medicine**, v. 223, p. 76–88, 2020.
- 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**, 2024.
- Fisher, K., & Phillips, C. A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* in vitro and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**, 101(6), 1232–1240, 2006.
- HARO-GONZÁLEZ, J. N.; CASTILLO-HERRERA, G. A.; MARTÍNEZ-VELÁZQUEZ, M.; ESPINOSA-ANDREWS, H. Clove Essential Oil (*Syzygium aromaticum* L. Myrtaceae): Extraction, Chemical Composition, Food Applications, and Essential Bioactivity for Human Health. **Molecules**, v. 26, n. 21, p. 6387, 2021.
- JU, J.; XU, X.; XIE, Y.; GUO, Y.; CHENG, Y.; QIAN, H.; YAO, W. Inhibitory effects of cinnamon and clove essential oils on mold growth on baked foods. **Food Chemistry**, v. 240, p. 850–855, 2018.
- KLEINUBING, N. R.; RAMIRES, T.; WÜRFEL, S. de F. R.; HAUBERT, L.; SCHEIK, L. K.; KREMER, F. S.; LOPES, G. V.; SILVA, W. P. da. Antimicrobial resistance genes and plasmids in *Campylobacter jejuni* from broiler production chain in Southern Brazil. *LWT*, v. 144, p. 111202, 1 jun. 2021.
- 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.
- MAGGINI, V.; SEMENZATO, G.; GALLO, E.; NUNZIATA, A.; FANI, R.; FIRENZUOLI, F. Antimicrobial Activity of *Syzygium aromaticum* Essential Oil in Human Health Treatment. **Molecules**, v. 29, n. 5, p. 999, 2024.
- MBAVENG, A. T.; KUETE, V. Chapter 29 - *Syzygium aromaticum*. In: KUETE, V. (org.). **Medicinal Spices and Vegetables from Africa**. [S. l.]: Academic Press, p. 611–625, 2017.
- MOORE, J. E.; CORCORAN, D.; DOOLEY, J. S. G.; FANNING, S.; LUCEY, B.; MATSUDA, McDOWELL, D. A.; MÉGRAUD, F.; MILLAR, B. C.; O' MAHONY, R.; O'RIODAN, L.; O' ROURKE, M.; RAO, J. R.; ROONEY, P. J.; SAILS, A.; WHYTE, P. *Campylobacter*. **Veterinary Research**, v. 36, p. 351–382, 2005.
- PUMBWE, L.; RANDALL, L. P.; WOODWARD, M. J.; PIDDOCK, L. J. V. Evidence for Multiple-Antibiotic Resistance in *Campylobacter jejuni* Not Mediated by CmeB or CmeF. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 4, p. 1289–1293, 2005.