

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BÁSICAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA  
AGRÍCOLA E DO AMBIENTE

Beatriz Pasqualli Fernandes

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS ASSOCIADOS A ÁCIDOS ORGÂNICOS APLICADOS NA  
NUTRIÇÃO ANIMAL**

Porto Alegre  
2021



Beatriz Pasqualli Fernandes

**AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS ASSOCIADOS A ÁCIDOS ORGÂNICOS APLICADOS NA  
NUTRIÇÃO ANIMAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola e do Ambiente do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a obtenção do título de mestra em Microbiologia Agrícola e do Ambiente.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amanda de Souza da Motta

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>.Lilian Kolling Girardini

Porto Alegre

2021



## **AGRADECIMENTOS**

A minha mãe, Janete Pasqualli, por sempre estar ao meu lado me apoiando e incentivando a ser melhor a cada dia. Obrigada por tanto ao longo da minha vida, você é meu pilar mais forte.

A meu namorado, Luiz Carasek Junior, pela paciência em me ouvir em todos os momentos e parceria ao me acompanhar ao longo dessa jornada. Você foi peça fundamental nessa conquista.

A minha família, que acreditaram e apoiaram minhas decisões em todos os momentos, comemorando cada conquista junto a mim. Obrigada por sempre me direcionarem no caminho certo.

A minha orientadora, Amanda da Souza da Motta, pela orientação, amizade, paciência e incentivo. Obrigada por confiar e possibilitar a realização deste trabalho em meio a tantas mudanças.

A minha coorientadora, Lilian Kolling Girardini, pela orientação e amizade. Obrigada por me receber, além de muito aprendizado, me possibilitou conhecer um grupo de pesquisa maravilhoso.

Aos colegas do laboratório de microbiologia da UNOESC, vocês foram fundamentais para desenvolvimento deste trabalho. Obrigada por me receberem tão bem e pelas trocas de experiência.

Aos meus amigos e colegas da BTA Aditivos LTDA, que sempre me apoiaram, ajudaram e me ouviram ao longo dessa trajetória. Obrigada pela troca de conhecimento e experiências, com vocês aprendo diariamente como a pesquisa é importante na indústria.

Aos professores e colaboradores da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Universidade do Oeste de Santa Catarina, pela excelência de ensino e pesquisa, é um privilégio aprender com vocês.

# AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS ASSOCIADOS A ÁCIDOS ORGÂNICOS APLICADOS NA NUTRIÇÃO ANIMAL<sup>1</sup>

Autor: Beatriz Pasqualli Fernandes  
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Amanda de Souza da Motta  
Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Lilian Kolling Girardini

## RESUMO

A utilização de antibióticos promotores de crescimento no controle de patógenos e como melhoradores das funções do trato gastrointestinal é uma prática comum na avicultura. Entretanto, buscaram-se alternativas para substituição desses compostos mantendo a qualidade e ganhos produtivos. Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante de óleos essenciais associados a ácidos orgânicos já disponíveis no mercado. Foram avaliados óleos essenciais de orégano (*Thymus capitatus*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e os ácidos orgânicos: propiônico, láctico e fórmico frente a 30 isolados ATCC e isolados de campo de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Pasteurella multocida*. O potencial antimicrobiano dos compostos foi testado através da avaliação de sensibilidade pelo método de difusão de gota, onde cinco compostos obtiveram atividade antibacteriana, sendo ácido fórmico com maior média de halos de inibição ( $32,09 \pm 1,01$  mm) e dentre os óleos essenciais, cravo-da-índia apresentou média de  $14,36 \pm 0,54$  mm. Dos compostos com atividade antimicrobiana, determinou-se a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), onde ácido fórmico obteve a menor CIM e CBM, seguida por ácido propiônico, ácido láctico, óleo essencial de cravo-da-índia e óleo essencial de alecrim. Através da CBM foi possível verificar a necessidade de maior concentração dos compostos para efetividade antibacteriana. Tais testes auxiliaram na seleção da avaliação de sinergia entre ácido fórmico e cravo-da-índia pelo método de *Checkerboard* frente a quatro isolados de campo, verificando que os compostos associados foram sinérgico frente à *Salmonella* Typhimurium ( $\Sigma$ FIC 0,37), *Salmonella* Enteritidis ( $\Sigma$ FIC 0,07) e *Escherichia coli* APEC ( $\Sigma$ FIC 0,265) e um efeito aditivo frente *Salmonella* Gallinarum ( $\Sigma$ FIC 0,515). Além disso, foram avaliados por método *in silico* (docking molecular) o potencial dos óleos essenciais e ácidos orgânicos em ligar-se a proteínas essenciais aos microrganismos, D-glutamato ligase (PDB ID: 1E0D) e DNA girase B (PDB ID: 4PRV) e confirmou-se que as moléculas com maior afinidade de ligação a essas estruturas foram ácido fórmico e cravo-da-índia. O poder antioxidante foi avaliado pelo método de captura do radical livre DPPH, sendo óleo essencial de cravo-da-índia possuiu maior atividade (IC<sub>50</sub>: 3,029 ug/mL), podendo ser comparado à atividade de antioxidantes sintéticos, como BHA (IC<sub>50</sub>: 3,31 ug/mL). Os resultados demonstram que os produtos testados possuem propriedades antimicrobianas e antioxidantes, sugerindo aplicabilidade em formulações sinérgicas, que possam vir a ser efetivas para uma ampla diversidade patógenos na avicultura.

<sup>1</sup>Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brasil. (76 p.) 07, 2021.

# EVALUATION OF THE ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT EFFECT OF ESSENTIAL OILS ASSOCIATED WITH ORGANIC ACIDS APPLIED IN ANIMAL NUTRITION<sup>1</sup>

Author: Beatriz Pasqualli Fernandes  
Advisor: Prof. Dr<sup>a</sup>. Amanda de Souza da Motta  
Co-Advisor: Prof. Dr<sup>a</sup>. Lilian Kolling Girardini

## ABSTRACT

The use of growth-promoting antibiotics to control pathogens and improve the functions of the gastrointestinal tract is a common practice in poultry. However, alternatives are sought to replace these compounds while maintaining quality and productive gains. In this context, this study aimed to evaluate the antimicrobial and antioxidant potential of essential oils associated with organic acids already available on the market. Essential oil of oregano (*Thymus capitatus*), clove (*Eugenia caryophyllata*), rosemary (*Rosmarinus officinalis*) and organic acids: propionic, lactic and formic were evaluated against 30 ATCC isolates and field isolates of *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* and *Pasteurella multocida*. The antimicrobial potential of the compounds was tested through the sensitivity evaluation by the drop diffusion method, where five compounds obtained antibacterial activity, being formic acid with the big mean inhibition halos ( $32.09 \pm 1.01$  mm) and among the oils essential, cloves had a mean of  $14.36 \pm 0.54$  mm. Of the compounds with antimicrobial activity, the minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal concentration (CBM) were determined, where formic acid had the lowest MIC, followed by propionic acid, lactic acid, clove essential oil and oil Rosemary essential. Through CBM, it was possible to verify the need for a higher concentration of compounds for antibacterial effectiveness. These tests determined the evaluation of synergy between formic acid and cloves by the *Checkerboard* method against four field isolates, verifying that the associated compounds were synergistic against *Salmonella* Typhimurium ( $\Sigma$ FIC 0.37), *Salmonella* Enteritidis ( $\Sigma$  FIC 0.07) and *Escherichia coli* APEC ( $\Sigma$ FIC 0.265) and an additive effect against *Salmonella* Gallinarum ( $\Sigma$ FIC 0.515). The potential of essential oils and organic acids to bind essential proteins to microorganisms, D-glutamate ligase (PDB ID: 1E0D) and DNA gyrase B (PDB ID: 4PRV) were evaluated by *in silico* method (molecular docking) and confirmed It is believed that the molecules with the highest binding affinity to these structures were formic acid and cloves. The antioxidant power was evaluated by the DPPH free radical capture method, and clove essential oil had higher activity (IC<sub>50</sub>: 3.029 µg/mL), which can be compared to the activity of synthetic antioxidants, such as BHA (IC<sub>50</sub>: 3.31 µg/ml). The results demonstrate that the products tested have antimicrobial and antioxidant properties, suggesting applicability in synergistic formulations, which may be effective for a wide variety of pathogens in poultry.

<sup>1</sup>Master of Science Thesis in Agricultural and Environmental Microbiology – Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, Brazil. (77 p.) 07, 2021.

## SUMÁRIO

|  |    |
|--|----|
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....   | 1  |
| <b>2. OBJETIVOS</b> .....  | 3  |
| 2.1 Objetivo Geral.....  | 3  |
| 2.2 Objetivos Específicos .....  | 3  |
| <b>3. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....  | 4  |
| 3.1 Panorama da avicultura.....  | 4  |
| 3.2 Microrganismos patogênicos.....  | 5  |
| 3.3 Promotores de crescimento na dieta de frangos.....   | 7  |
| 3.4 Óleos essenciais.....  | 10 |
| 3.5 Ácidos orgânicos .....   | 14 |
| 3.6 Docking molecular.....   | 16 |
| <b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....   | 18 |
| 4.1 Compostos estudados: óleos essenciais e ácidos orgânicos.....  | 18 |
| 4.2 Manutenção das bactérias testadas.....   | 18 |
| 4.2.1 Padronização dos microrganismos testados.....  | 19 |
| 4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e ácidos orgânicos testados isoladamente frente às bactérias indicadoras.....                 | 19 |
| 4.4 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais e ácidos orgânicos testados isoladamente frente às bactérias indicadoras.....     | 20 |
| 4.5 Determinação da Concentração bactericida mínima (CBM).....   | 22 |
| 4.6 Teste de sinergismo pelo método de <i>checkerboard</i> .....   | 22 |
| 4.7 Cinética de inativação bacteriana.....   | 25 |
| 4.8 Análise da atividade antioxidante dos compostos testados.....  | 25 |
| 4.9 Docking molecular.....   | 27 |
| <b>5. RESULTADOS</b> .....   | 31 |
| 5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e ácidos orgânicos testados isoladamente frente às bactérias estudadas.....                   | 30 |
| 5.2 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais e ácidos orgânicos testados isoladamente frente às bactérias.....                 | 32 |
| 5.3 Determinação da Concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais e ácidos orgânicos testados isoladamente frente às bactérias indicadoras..... | 33 |

|  |    |
|--|----|
| 5.4 Determinação de sinergismo entre ácido fórmico e óleo essencial de cravo-da-índia pelo método de <i>checkerboard</i> .....   | 34 |
| 5.5 Determinação da cinética de inativação de <i>Escherichia coli</i> APEC e <i>Salmonella</i> Gallinarum frente aos compostos ácido fórmico e óleo essencial de cravo-da-índia..... | 35 |
| 5.6 Estudo por meio de Docking molecular do potencial de óleos essenciais e ácidos orgânicos na inibição de <i>Salmonella</i> e <i>Escherichia coli</i> .....                        | 37 |
| 5.7 Determinação da atividade antioxidante.....  | 39 |
| <b>6. DISCUSSÃO</b> .....  | 40 |
| <b>7. REFERÊNCIAS</b> .....  | 48 |
| <b>8. APÊNDICE</b> .....   | 64 |

## LISTA DE TABELAS

|                        | <b>Página</b> |
|------------------------|---------------|
| <b>Tabela 1.</b> ....  | 17            |
| <b>Tabela 2.</b> ....  | 18            |
| <b>Tabela 3.</b> ....  | 20            |
| <b>Tabela 4.</b> ....  | 21            |
| <b>Tabela 5.</b> ....  | 22            |
| <b>Tabela 6.</b> ....  | 26            |
| <b>Tabela 7.</b> ....  | 24            |
| <b>Tabela 8.</b> ....  | 31            |
| <b>Tabela 9.</b> ....  | 32            |
| <b>Tabela 10.</b> .... | 33            |
| <b>Tabela 11.</b> .... | 34            |
| <b>Tabela12.</b> ..... | 37            |
| <b>Tabela 13.</b> .... | 38            |

## LISTA DE FIGURAS

|                       | <b>Página</b> |
|-----------------------|---------------|
| <b>Figura 1</b> ..... | 22            |
| <b>Figura 2</b> ..... | 24            |
| <b>Figura 3</b> ..... | 28            |
| <b>Figura 4</b> ..... | 30            |
| <b>Figura 5</b> ..... | 31            |
| <b>Figura 6</b> ..... | 35            |
| <b>Figura 7</b> ..... | 36            |

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

|        |  |
|--------|--|
| AAI    | Atividade antioxidante                                   |
| ABPA   | Associação Brasileira de Proteína Animal                 |
| AMH    | Ágar Muller Hinton                                       |
| APC    | Antibióticos promotores de crescimento                   |
| APEC   | <i>E. coli</i> patogênica para aves                      |
| ATCC   | <i>American Type Culture Collection</i>                  |
| BHA    | <i>Butylated hydroxyanisole</i>                          |
| BHI    | <i>Brain Heart Infusion</i>                              |
| BHT    | <i>Butylated hydroxytoluene</i>                          |
| BPF    | Boas práticas de fabricação                              |
| CBM    | Concentração bactericida mínima                          |
| CDPA   | Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária    |
| CIM    | Concentração inibitória mínima                           |
| CLSI   | <i>Clinical &amp; Laboratory Standards Institute</i>     |
| DEMIP  | Laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia |
| DNA    | Ácido desoxirribonucleico                                |
| DPPH   | 2,2-difenil-1-picrilhidrazila                            |
| EAGGEC | <i>E. coli</i> enteroagregativa                          |
| EHEC   | <i>E. coli</i> enterohemorrágica                         |
| EIEC   | <i>E. coli</i> enteroinvasivas                           |
| EPEC   | <i>E. coli</i> enteropatogênicas                         |
| ETEC   | <i>E. coli</i> enterotoxigênicas                         |
| IBGE   | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística          |
| IC 50  | Inibição de 50% do radical livre                         |
| IFI    | Índice da Fração Inibitória                              |
| SEA    | <i>Staphylococcal enterotoxins A</i>                     |
| SEB    | <i>Staphylococcal enterotoxins B</i>                     |
| SEC    | <i>Staphylococcal enterotoxins C</i>                     |
| SED    | <i>Staphylococcal enterotoxins D</i>                     |
| SEE    | <i>Staphylococcal enterotoxins E</i>                     |

|       |   |
|-------|---|
| SEH   | <i>Staphylococcal enterotoxins H</i>                |
| MAPA  | Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento |
| MG/ML | Miligramma por mililitro                            |
| MM    | Milímetros  |
| NG    | Nanograma   |
| NMEC  | <i>E. coli</i> meningite neonatal                   |
| OE    | Óleo essencial                                      |
| OMS   | Organização Mundial da Saúde                        |
| PCA   | <i>Plate Count Agar</i>                             |
| PDB   | <i>Protein Data Bank</i>                            |
| PNSA  | Programa Nacional de Sanidade Avícola               |
| TGI   | Trato Gastrointestinal                              |
| UFC   | Unidades Formadoras de Colônia                      |
| UPEC  | <i>E. coli</i> uropatogênica                        |
| UFRGS | Universidade Federal do Rio Grande do Sul           |
| µL    | Microlitro  |

## 1. INTRODUÇÃO

A avicultura é um dos setores de maior crescimento e desenvolvimento econômico no Brasil. Segundo o relatório anual de 2021 da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA), em 2020 a produção de carne de frango foi a mais expressiva comparada nos últimos 10 anos, com 13.845 milhões de toneladas de carne produzidas. O destino da produção brasileira de carne de frango em 2020 foi de 69% para mercado interno e 31% para exportação, sendo que China, Arábia Saudita e Japão foram os países que mais importaram do Brasil (ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL, 2021).

No primeiro trimestre de 2021, segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, já foi abatido 1,55 bilhão de cabeças de frango, um aumento de 2,4% em relação ao trimestre equivalente do ano anterior (IBGE, 2021). Esses dados demonstram o consumo crescente de carne de frango e a indústria precisa estar preparada para aumentar seu porte produtor, atender os padrões de qualidade e controlar problemas sanitários sem perder o custo-benefício em manter o mercado ativo e competitivo.

Medidas rigorosas de biossegurança, boas práticas de produção em granjas e boas práticas de fabricação na indústria constituem os princípios básicos de prevenção contra contaminações e infecções das aves. No entanto, é fundamental associar estratégias de controle sanitário. A utilização de antibióticos promotores de crescimento (APC) para controle de patógenos e como melhoradores das funções do trato gastrointestinal é uma prática que ainda é adotada. No entanto, a mesma vem sendo banida por diversos países, inclusive importadores de carne de frango brasileira, devido às suas consequências indesejadas, como aumento da resistência de bactérias patogênicas (VIECO-SALZ et al., 2019).

Em consequência, buscam-se alternativas para substituição dos APC, mantendo a qualidade e ganhos na produção. Para atender esta necessidade do mercado, óleos essenciais e ácidos orgânicos aplicados na dieta de frangos vêm demonstrando capacidade em realizar o controle microbiológico, melhorando o desempenho zootécnico e aumentando os ganhos produtivos (RADÜNZ et al., 2019; BOCHIO, 2019).

Sendo assim, é importante desenvolver e avaliar associações entre ácidos orgânicos e óleos essenciais que potencializem os seus efeitos

antimicrobianos contra microrganismos de importância para cadeia avícola. Além de, explorar as propriedades antioxidantes de óleos essenciais que podem ser aplicados na ração animal, realizando o controle de oxidação lipídica.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante de óleos essenciais associados a ácidos orgânicos já disponíveis no mercado.

### 2.2 Objetivos Específicos

#### 2.2.1 Objetivo específico 1

Verificar o potencial antimicrobiano dos óleos essenciais de alecrim, orégano e cravo-da-índia e ácidos fórmico, propiônico e láctico aplicados de forma isolada e conjunta frente a cepas ATCC (*American Type Culture Collection*), isolados ambientais e isolados clínicos de *Salmonella* spp., *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Enterobacter cloacae* e *Pasteurella multocida*.

#### 2.2.2 Objetivo específico 2

Avaliar associações entre óleos essenciais e ácidos orgânicos, a fim de verificar possível sinergia entre os compostos e maior ação antimicrobiana frente aos microrganismos de interesse para cadeia avícola.

#### 2.2.3 Objetivo específico 3

Avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais e ácidos orgânicos em comparação com antioxidantes sintéticos, a fim de verificar o potencial de aplicação em ração como aditivo antioxidante.

#### 2.2.4 Objetivo específico 3

Avaliar a afinidade dos compostos estudados frente a proteínas essenciais aos microrganismos estudados a fim de predizer possíveis interações entre as moléculas.

### 3. REVISÃO DA LITERATURA

#### 3.1 Panorama da avicultura

A avicultura no mundo está em constante desenvolvimento e em 1968 as proteínas de origem bovina e suína lideravam em produção e comercialização, enquanto o setor de aves recebia poucos investimentos. No entanto, atualmente a carne suína é líder de produção e a carne de aves ocupa o segundo lugar, com produção ampliada em 16 vezes nos últimos 50 anos, tendo grandes chances de tornar-se nos próximos anos o setor de carnes mais importante (TALAMINI; MARTINS; SANTOS FILHO, 2018).

Segundo o relatório anual da ABPA de 2021, a produção total de carne de frango no mundo em 2020 foi de 100.413 mil toneladas, e os principais produtores foram os Estados Unidos, seguido por China e Brasil. No cenário de exportação, o Brasil lidera com 4.231 mil toneladas de frango exportadas, sendo que os países que mais importam são China, Arábia Saudita e Japão. Mesmo com redução nas exportações, principalmente para Arábia Saudita e União Europeia, devido à desvalorização da moeda brasileira e o aumento dos custos para produção, o Brasil mantém-se entre os países com destaque na produção avícola (TALAMINI; MARTINS; SANTOS FILHO, 2018).

No Brasil, o ramo da avicultura vem desenvolvendo-se principalmente pelas formas de integração da cadeia, em que a indústria fornece os pintos e o produtor é responsável por devolvê-los saudáveis e no peso adequado para que os frigoríficos realizem o abate e comercialização (FREITAS, BERTOGLIO, 2001). Além disso, o melhoramento genético, os avanços na área de nutrição animal e sanidade tornam o mercado brasileiro competitivo (SARCINELLI et al., 2007).

O sul do país ganha destaque no setor, sendo a região que mais evoluiu nos últimos 20 anos, comparada às regiões sudestes e centro-oeste, com grande quantidade de cooperativas e indústrias na região (ZEN et al., 2014). O Rio Grande do Sul tem papel fundamental no cenário da avicultura, sendo o terceiro estado com maiores porcentagens de abate (13,82%) e exportação no país (17,58%).

### 3.2 Microrganismos patogênicos

Na avicultura, os microrganismos patogênicos representam problemas em toda cadeia, pois geram perdas econômicas significativas quando não controlados. O desenvolvimento acelerado do mercado necessita de agilidade e maior produtividade na fabricação de carne de frango, podendo tornar medidas de biossegurança e boas práticas de fabricação negligenciadas. O manejo sanitário nos aviários, como vazio sanitário entre alojamentos e higienização completa do aviário são medidas básicas, mas nem sempre seguidas (VALANDRO, 2009). Além disso, a microbiota presente em órgãos como intestino pode contaminar carcaças, se a evisceração não ocorrer conforme determinado durante o abate das aves (ROUGER; TRESSE; ZAGOREC, 2017).

Os principais microrganismos envolvidos em contaminações que possuem potencial em causar danos ao consumidor são: *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella Enteritidis* (PARRA et al., 2018; MULDER, SCHLUNDT, 1999; AUTHORITY, 2016).

*Listeria monocytogenes* é um bastonete Gram-positivo, anaeróbio facultativo, não esporulado, catalase positiva e não formador de cápsula. Possui motilidade a 25°C e capacidade de se replicar em temperaturas que variam de 1°C a 45°C. A faixa de pH que permite o desenvolvimento do microrganismo varia de 4,1 a 9,6 (JAY, 2005; ROBERTS et al., 2020).

Surtos alimentares envolvendo *L. monocytogenes* podem ocasionar diversos danos à saúde do consumidor, como aborto, meningite e septicemia, principalmente em grupos de imunocomprometidos (COSSART, LEBRETON, 2014). Isso porque o patógeno possui propriedades de virulência como: produção de toxinas e invasão intracelular, podendo deslocar-se para corrente sanguínea e invadir outras células (JAY, 2005). Sua ampla distribuição na natureza como em carne, leite, solo e fezes de animais em conjunto com sua capacidade de persistir nos alimentos em diversas temperaturas e pH torna o microrganismo responsável por diversos surtos alimentares registrados (CRUZ et al., 2008; BUCHANAN et al., 2017; EUROPEAN FOOD SAFETY, 2015).

*Staphylococcus aureus* são caracterizados como cocos Gram-positivo, imóveis, não esporulados, apresentam capacidade de crescimento em aerobiose e catalase positiva (TRABULSI, ALTERTHUM, 2008). É encontrado naturalmente

em humanos na nasofaringe, mãos, ouvidos e pele, além de animais também serem portadores assintomáticos do microrganismo (JAY, 2005). Sua distribuição no ambiente permite que contamine facilmente os alimentos, associado à sua capacidade de replicar-se em temperaturas entre 7°C a 47,8°C, sobreviver em meios com até 20% de cloreto de sódio e pH de 4 a 9,8 torna-se um dos patógenos mais envolvidos em surtos transmitido por alimentos (TONG et al., 2015; TONDO, 2019). Quando presente nos alimentos, algumas cepas de *S. aureus* em condições ideais produzem enterotoxinas estafilocócicas, sendo as mais comuns staphylococcal enterotoxins A (SEA), staphylococcal enterotoxins B (SEB), staphylococcal enterotoxins C (SEC), staphylococcal enterotoxins D (SED), staphylococcal enterotoxins E (SEE) e staphylococcal enterotoxins H (SEH). Estas são resistentes a calor e enzimas proteolíticas, e uma quantidade de 20 ng já é suficiente para desencadear intoxicação alimentar no ser humano (KADARIYA; SMITH; THAPALIYA, 2014). Após a ingestão do alimento contaminado, os sintomas iniciam dentro de 4 horas, geralmente com náuseas, dores abdominais, sudorese e dor de cabeça (JAY, 2005).

*Escherichia coli* são bastonetes Gram-negativos, móveis, não esporuladas, anaeróbicas facultativas e com temperatura ótima de crescimento de 37°. Fazem parte da microbiota intestinal de mamíferos e aves, sendo que a maior parte dos sorotipos não apresenta fatores de virulência e não desencadeiam doenças (FERREIRA & KNÖBL, 2009; TOUCHON et al., 2020). Entretanto, alguns sorotipos desencadeiam patologias entéricas e extra intestinais devido a diferentes antígenos O (lipopolissacarídeo) e H (flagelar) presentes em sua estrutura (BERCHIERI et al., 2009; TONDO, 2019). A classificação se dá nos seguintes grupos virulentos: *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasivas (EIEC), *E. coli* enteropatogênicas (EPEC), *E. coli* enterotoxigênicas (ETEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC) (JAY, 2005; FERREIRA & KNÖBL, 2009; SAVIOLLI, 2010). Cada grupo possui mecanismos específicos para desencadear doenças, podendo produzir uma gama de toxinas, colonização do trato gastrointestinal e invasão celular. Para a indústria avícola, o patotipo APEC é causador de maior morbidade e mortalidade de frangos, pois são capazes de expressar adesinas, sideróforos e sequestrar íons de ferro da corrente sanguínea e tecido das aves (REIS, 2011),

gerando pericardites, hepatites, endocardites, doenças respiratórias e doenças reprodutivas (LYNNE et al., 2012).

O gênero *Salmonella* é pertencente à família *Enterobacteriaceae*, são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, anaeróbios facultativos, catalase positiva e oxidase negativa. A maioria das espécies apresenta motilidade, exceto *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (LEVINSON, 2005). Os microrganismos pertencentes ao gênero foram divididos em três espécies conforme suas características genéticas e bioquímicas: *S. enterica*, *S. bongori* e *S. subterrânea* (BRENNER et al., 2002). *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis pertencem ao primeiro grupo e são microrganismos recorrentes em surto alimentares (COSBY et al., 2015; COLOMBE et al., 2019; BRASIL, 2019).

Infecções causadas por *Salmonella* ocorrem pela veiculação do microrganismo pela via fecal-oral, pois o mesmo habita naturalmente o trato gastrointestinal de animais. A dose infectante varia de  $10^6$  a  $10^8$  UFC/g, ocasionando dores abdominais, dor de cabeça, febre e sonolência. Em casos mais graves, pode desencadear septicemia e meningite (BRASIL, 2011; GABARON et al., 2015;). Os principais alimentos envolvidos em surtos de salmonelose são carne de frango e ovos (CANGEN, 2011; CDC, 2016). A contaminação de frangos pode ocorrer tanto durante o desenvolvimento dos animais, ao consumirem ração ou água contaminada, quanto durante o abate, por falhas na evisceração ou falta de boas práticas de fabricação (BPF) (HAMIDI et al., 2014; DIAS et al., 2016; BERGAMO et al., 2015).

Também pertencente à família *Enterobacteriaceae*, encontra-se o gênero *Enterobacter* spp., bacilos gram-negativos que são encontrados em diferentes locais, como a microbiota intestinal da maioria dos animais e no homem. Dentre as 13 espécies classificadas como membro do gênero, *Enterobacter cloacae* é frequentemente associada a doenças clínicas no homem, causando infecções no trato urinário, trato respiratório, pele e sistema nervoso central (LEE et al., 2010). *Enterococcus* spp., da mesma forma, compõe a microbiota intestinal de seres humanos e animais, estando amplamente distribuídos no meio ambiente, sendo que, *E. faecalis* é frequentemente associado a doenças como bacteremias, septicemia, infecções do trato urinário e feridas (ZOU et al., 2011). As transmissões desses patógenos podem ocorrer pelo contato direto com animais contaminados ou pela ingestão de alimentos contaminados (VIGNAROLI et al.,

2011).

*Pasteurella multocida* pertencente à família *Pasteurellaceae*, é um bacilo gram-negativo, imóvel, não formador de esporos, anaeróbio facultativo e que apresenta crescimento ótimo a 37 °C (NASCIMENTO et al., 2009). O microrganismo é causador de diversas doenças em animais, em aves destaca-se a Cólera Aviária, que ocasiona anorexia, cianose e diarreia, levando a morbidade e alta mortalidade no setor avícola (GLISSON, 2008).

### 3.3 Promotores de crescimento na dieta de frangos

A nutrição animal dentro da cadeia avícola é um dos fatores determinantes para produtividade e rendimento de carcaças (SOUZA et al., 2008). As formulações oferecidas aos animais são à base de aminoácidos, minerais, vitaminas, ácidos graxos e água (BELLAVIER, 2003) e visam atender às necessidades nutricionais, aproveitamento dos ingredientes, melhorar a digestibilidade e proporcionar a expressão do potencial genético das aves (ARAUJO et al., 2007).

Para atingir os melhores padrões de qualidade na nutrição animal, buscam-se várias alternativas, como a nutrição de precisão, que visa desenvolver dietas balanceadas alcançando o máximo de desempenho animal com menor custo. Associadamente é realizada a inclusão de doses subterapêuticas de antibióticos, para controle de microrganismos patogênicos e melhorador das funções do trato gastrointestinal (TRAESELI et al., 2011; UTIMI, 2016).

O trato gastrointestinal (TGI) das aves é formado por intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) e intestino grosso (ceco, colón e cloaca) e possui função principal de absorção de nutrientes e barreira contra patógenos (GERBER, 2015). Os processos de absorção acontecem principalmente no intestino delgado, e é fundamental manter o tecido epitelial íntegro, para que a eficiência de absorção de alimentos seja significativa, resultando em ganhos no desempenho e conversão alimentar (CASTRO, 2005). A microbiota das aves é composta por mais de 30 gêneros bacterianos, com concentração populacional que varia de  $10^3$  a  $10^{11}$  UFC/grama de conteúdo intestinal e é responsável por contribuir nos processos digestivos, maturação intestinal, produção de energia e inibição do desenvolvimento de bactérias patogênicas (SAKOMURA et al., 2014). Em função da influência da microbiota no desenvolvimento das aves, os compostos aplicados

na alimentação animal precisam apresentar mecanismos que modulem respostas favoráveis sobre o metabolismo do hospedeiro (MACARI et al., 2014).

Devido à importância em manter a saúde intestinal, os APC são utilizados desde 1950 na alimentação animal para prevenir distúrbios digestivos, diminuir a concentração de microrganismos competidores pelos nutrientes, reduzir a produção de metabólitos que deprimem o crescimento dos animais e reduzir o tamanho e peso do TGI, aumentando a eficiência de absorção dos nutrientes (GONZALES; MELLO; CAFÉ, 2012). Além disso, os APC alteram o metabolismo da microbiota intestinal, diminuindo e controlando a população bacteriana, resultando em maior disponibilidade de nutrientes para absorção no TGI das aves e melhorias nas condições de saúde e integridade intestinal (SAKOMURA et al., 2014).

Para um antibiótico ser considerado APC, deve apresentar as seguintes características: melhorar o desempenho zootécnico das aves, ser efetivo em pequenas doses, não ser utilizado em terapêuticas de humanos e veterinário, não possuir resistência cruzada com outros antibióticos, manter a flora gastrointestinal normal, não ser absorvido no TGI, ser atóxico, não ser mutagênico ou carcinogênico, ser estável no processo de fabricação da ração, baixo custo e não deixar resíduos na carcaça (JUNQUEIRA & DUARTE, 2005).

No entanto, os APC vêm sendo banidos da nutrição animal devido ao desenvolvimento de bactérias resistentes e aumento de reações de hipersensibilidade em humanos, impactando negativamente na saúde pública mundial. Estima-se que até 2050, microrganismos resistentes causem a morte prematura de 300 milhões de pessoas, com perda de até US\$ 100 trilhões de dólares para economia global (GONZALES; MELLO; CAFÉ, 2012; LONDRES, 2014; SOUCY et al., 2015; VIECO-SAIZ et al., 2019)

As bactérias possuem diversos mecanismos que lhes permitem responder a diferentes ameaças ambientais, como antibióticos. Dentre esses mecanismos, pode-se citar a adaptação por estratégias genéticas, como mutações em genes associados ao mecanismo de ação do antibiótico e aquisição de genes resistentes através de transferência horizontal. Além disso, a resistência pode ser alcançada por diferentes vias bioquímicas, como produção de enzimas pelas bactérias, que reduzem a permeabilidade ou inativam a droga, desenvolvimento de rotas metabólicas alternativas para substituir as que eram alvos, alterações

dos sítios de ação dos antimicrobianos e superexpressão de bombas de efluxo que expõem a droga da célula (QUINN et al., 2005; MUNITA, ARIAS, 2016).

A seleção de bactérias resistentes a antibióticos é atribuída à utilização abusiva dos mesmos. Ainda, estes microrganismos resistentes podem ser transferidos para o homem através do contato direto com os animais durante o manejo no campo e na indústria, além de consumo do produto final contendo bactérias com genes de resistência. Outra problemática verificada nos últimos anos é a presença de resíduos de antibióticos no ambiente, incluindo águas superficiais, subterrâneas e solo, ligadas a falta de manejo em granjas e incorreto tratamento das excretas (NEWELL et al., 2010; CHANTZIARAS et al., 2014; BEZERRA et al., 2017; GRANADOS-CHINCHILLA; RODRÍGUEZ, 2017; ALEXANDRINO et al., 2020).

Considerando os efeitos negativos que os APC desencadeiam e as mudanças de exigência do mercado consumidor, a Suécia foi o primeiro país a proibir o uso de antibióticos para este fim em 1993, ação seguida pela Dinamarca em 1998 (CASTANON, 2007). Em 2006, a União Europeia publicou o regulamento N° 1831/2003 que proibia a utilização de antibióticos na alimentação animal como promotores de crescimento (UNIÃO EUROPEIA, 2003). A regulamentação gerou impactos internacionais. Em 2018, o Brasil publicou por meio da Portaria N° 171 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) intenção de proibição dos antibióticos tilosina, lincomicina, virginiamicina, bacitracina e tiamulina como APC referenciando as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) pela restrição de antibióticos importantes para medicina humana (BRASIL, 2018). Destes, encontram-se na lista de substâncias proibidas como aditivos melhoradores de desempenho os antibióticos tilosina, lincomicina e tiamulina (BRASIL, 2020).

Com as restrições ocorrendo nos principais países produtores e importadores, é necessária à busca de aditivos alternativos que substituam de forma eficiente os promotores de crescimento à base de antibióticos, gerando os benefícios e ganhos para desenvolvimento do setor.

### 3.4 Óleos essenciais

Em decorrência das proibições e diminuição do uso de antibióticos na alimentação animal, buscam-se alternativas para controle microbiológico e

melhoradores de desempenho zootécnico, e os óleos essenciais vêm demonstrando capacidade de suprir esta necessidade (BASTOS-LEITE et al., 2016; RADÜNZ et al., 2019).

Óleos essenciais são compostos derivados de plantas e as mesmas produzem dois tipos de metabólitos: primário e secundário. Os metabólitos primários são encontrados em todas as plantas e são excretados na forma de açúcar e lipídios, já os secundários são componentes encontrados em alguns gêneros específicos de plantas, dentre eles os óleos essenciais, estes que são definidos como extratos hidrodestilados de compostos voláteis de plantas (HASHEMI; DAVOODI, 2011). Nas plantas, óleos essenciais desempenham função de defesa contra patógenos e pragas, atraem organismos benéficos e protegem contra estresses abióticos, como mudanças de temperatura e luminosidade (PERES, 2007). Esses compostos são classificados conforme propriedades física, química e biológica, divididos em grupos: alcalóides (álcoois, aldeídos, cetonas, éteres, ésteres e lactonas), glicosídeos, compostos fenólicos, saponinas, mucilagens, flavonóides, terpenóides (mono e sesquiterpênicos e esteróides), taninos e óleos essenciais (BAKKALI et al., 2008). Podem ser isolados por meios físicos, prensagem ou destilação, ou por métodos de fermentação e atividade enzimática. Possuem odor característico, são solúveis em solventes orgânicos e insolúveis em água (FRANZ; NOVAK, 2009; KRISHAN; NARANG, 2014).

Os óleos essenciais geralmente possuem vários compostos bioativos, entre 20 a 60, no entanto dois ou três são majoritários, como no caso dos fenóis, que possuem timol e carvacrol presentes no óleo essencial de orégano. A presença de vários princípios ativos promove um efeito sinérgico benéfico, fornecendo suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes e melhoradores do desempenho animal (BAKKALI et al., 2008; ZHAI et al., 2018).

A utilização dos óleos essenciais como substitutos aos APC vem ocorrendo devido à capacidade em melhorar a microbiota intestinal, aumentar o desempenho produtivo, estimular produção de enzimas, aumentar a absorção de nitrogênio e melhorar a conservação de rações devido às propriedades antioxidantes (CHILANTE; KUSSAKAWA; FLEMMING, 2012; FERNANDES et al., 2015; FASCINA et al., 2017). Teixeira e colaboradores (2013) avaliaram maior aceitabilidade e aumento do consumo de rações ou água tratadas com óleos

essenciais, aumentando o ganho de peso em menor tempo.

Os mecanismos de propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais diferem de acordo com os ativos majoritários e os diferentes gêneros de microrganismos. Avaliou-se a inativação bacteriana através do efeito na estrutura na parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas, alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática e conseqüentemente ocasionando interrupções dos processos essenciais da célula. Além disso, alguns compostos possuem capacidade de atravessar a membrana e interagir com sítios específicos no meio intracelular. Verificou-se também, propriedades antimicrobianas de alguns óleos na inativação de enzimas microbianas, como ATPase, histidina descarboxilase, amilase e protease (DORMAN; DEANS, 2000; TROMBETTA et al., 2005; SWAMY et al., 2016; RAO et al., 2019).

É importante destacar o poder antioxidante que os óleos essenciais apresentam, isso porque rações oferecidas a aves possuem fontes lipídicas significativas para aumentar o percentual de energia das dietas. Óleos e gorduras são suscetíveis a processos de deterioração devido à oxidação e rancidez, acarretando em perdas energéticas, alteração de características organolépticas e diminuição da palatabilidade (DUARTE, 2007). Além disso, os processos de oxidação resultam em moléculas tóxicas as aves, como os peróxidos, aldeídos, acetonas, hidroxiácidos, hidrocarbonetos e polímeros, que impactam negativamente no desempenho e saúde animal (BARON; PAZINATTO; BARON, 2020).

Óleos essenciais, por apresentarem compostos fenólicos em sua composição, como flavonoides e terpenóides, possuem capacidade em se ligar a radicais livres, interceptando e neutralizando os processos oxidativos, conseqüentemente, auxiliando na conservação e manutenção das propriedades nutricionais das rações ofertadas as aves (SAKOMURA et al., 2014).

Nos processos digestivos, atuam como estimulantes de produção de suco gástrico e pancreático, favorecendo a secreção enzimática e melhorando a digestibilidade de ingredientes. Ao melhorar os processos de digestibilidade, são capazes de aumentar o aproveitamento da energia de dietas e reduzir a energia para manutenção do TGI (MELLOR, 2000).

#### 3.4.1 Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)

O gênero *Origanum* é composto por 39 espécies, das quais a maior parte é encontrada no Mediterrâneo e é pertencente à família *Lamiaceae* (SOZMEN et al., 2012). É uma planta caracterizada pela forma de arbusto, desenvolvendo-se em áreas montanhosas rochosas (SNOGERUP, 1971). Suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes estão relacionadas a dois compostos ativos principais: timol e carvacrol, que podem estar presentes em até 98% da sua composição total. Há presença de outros compostos em menor quantidade, como monoterpenos,  $\gamma$ -terpineno ou p-cimeno, nos quais também já foram verificadas atividades biológicas significativas (ANTUONO; GALLETI; BOCCHINI, 2000; GARCÍA; SANZ, 2001; KHAN et al., 2018).

Os efeitos benéficos da aplicação de óleo essencial de orégano na conservação de alimentos vêm sendo reportado por vários autores. O potencial antimicrobiano foi testado por Bozin (2006), que verificou que óleo essencial de orégano foi mais efetivo comparado a outros óleos, além de demonstrar efeito antimicrobiano sobre cepas multirresistentes de *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. Em estudo realizado por Pombo et al., (2018), o efeito inibitório contra bactérias foi mais significativo para óleo de orégano comparado ao de cravo, no qual bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) foram mais susceptíveis que Gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella* sp.).

A aplicação do óleo essencial de orégano em dietas de frango com objetivo de melhoramento zootécnico foi realizada por Dias et al. (2015) que verificaram a diminuição de contagens de bactérias patogênicas, aumento de microrganismos benéficos e aumento do coeficiente de metabolização, podendo ser empregado como aditivo zootécnico equilibrador de microbiota intestinal. Em acordo com achados por Mountzouris et al., (2011) que, ao adicionar óleos essenciais de orégano, anis e laranja, verificou aumento das taxas de metabolização dos nutrientes, auxiliando no ganho de energia dos frangos.

#### 3.4.2 Óleo essencial de cravo-da-índia (*Caryophyllus aromaticus* L)

O cravo-da-índia é obtido a partir do craveiro-da-índia, uma árvore que cresce até 12 metros de altura, possui folhas ovais e flores vermelhas. Os cravos são encontrados nos botões de flores maduras, sendo comercializados na forma

de botão floral seco (ALMA et al., 2007).

A obtenção do óleo essencial de cravo pode ser realizada a partir da extração das flores, caules e folhas da árvore. Seu composto ativo predominante é o eugenol, encontrado em quantidades entre 80 a 95% (GUENETTE et al., 2007). As propriedades antimicrobianas do eugenol são ligadas à capacidade de causar danos à membrana citoplasmática dos microrganismos, desestabilizando os compostos intracelulares (DEVI et al., 2010).

Kamatou, Vermaak e Viljoen (2012) verificaram propriedades antimicrobianas do eugenol sobre uma vasta gama de microrganismos, como *Escherichia coli*, *Bacillus cereus*, *Helicobacter pylori*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Streptococcus pneumoniae* e *Streptococcus pyogenes*. Este estudo que obteve resultados semelhantes ao de Radünz et al. (2018), que demonstrou forte ação inibitória e bactericida do eugenol frente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella Typhimurium*.

O composto eugenol apresenta propriedades antioxidantes importantes para conservação de rações, através da ação na fase inicial da cascata de reação de oxidação, impedindo a peroxidação lipídica. Radünz et al. (2018), também verificara forte atividade antioxidante do óleo essencial de cravo-da-índia, determinada pelo método DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), sugerindo o uso do composto para controle dos radicais livres. Estes resultados foram concordantes com os encontrados por Leem et al., (2011), que através do mesmo método demonstraram a capacidade do composto em evitar a formação dos radicais livres.

### 3.4.3 Óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*)

*Rosmarinus officinalis* é uma erva aromática usada há muitos anos para preservação de alimentos. A planta é pertencente à família *Lamiaceae*, nativa da região da Europa, desenvolvendo-se em vários países de clima temperado, como Austrália, Portugal e Brasil (VALGIMIGLI, 2012; CRISPIM, FOGGIATO, 2013). Advém de um arbusto pequeno, ramificado e de cor verde acinzentado (MAY et al., 2010).

Os principais constituintes químicos da planta são alcanfor, 1-8 cineol,  $\alpha$ -pineno, borneol e canfeno A concentração dos compostos depende da origem e

estado vegetativo (FERNANDES et al., 2014). Os compostos ativos principais são ácido carnósico, ácido rosmarínico, ácido ursólico, ácido cafeico e carnosol (WANG et al., 2012).

Os compostos fenólicos encontrados nesta planta apresentam forte atividade antioxidante e antibacteriana, principalmente o ácido carnósico e o carnosol, que representam 90% da atividade antioxidante (MOHAMED, ABD-ELHAKIM, FAROUK 2016). Bajalan et al. (2017), demonstraram a efetividade do óleo essencial de alecrim no controle de cepas, como *Escherichia coli* e verificaram propriedade antioxidante moderada. Dados em concordância com Gonçalves (2017), que em sua pesquisa avaliou a efetividade do óleo essencial de alecrim, e demonstrou efeito antimicrobiano satisfatório frente a *Enterococcus faecalis*.

### 3.5 Ácidos orgânicos

A utilização de ácidos orgânicos como aditivos melhoradores de desempenho está se tornando uma alternativa para substituição aos APC na nutrição animal (ZANELATO, 2009). Os ácidos orgânicos são derivados de tecidos vegetais ou animal e de fermentação microbiana. Sua estrutura química geral é composta por R-COOH, derivados dos ácidos carboxílicos (SOLOMONS, FHYHLE, 2005). Na alimentação animal são empregados ácidos fracos de cadeia curta (C1 – C7), que produzem menores quantidades de prótons ao se dissociarem, sendo mais efetivos no controle microbiológico (BELLAVAR, SCHEUERMANN, 2004).

O controle microbiológico realizado por ácidos orgânicos ocorre pela ação do ácido em conformação não dissociada. Isso porque tornam-se solúveis em lipídios, possibilitando sua passagem pela membrana celular bacteriana. No interior da célula, o ácido acidifica o citoplasma, alterando a homeostase celular, bloqueando sistemas enzimáticos, transporte de nutrientes, síntese de ácido desoxirribonucleico (DNA) e aumentando a pressão osmótica (PICKLER et al., 2012; GAUTHIER, 2005; LANGHOUT, 2005).

O controle de patógenos na microbiota intestinal realizado pelos ácidos orgânicos reduz metabólitos produzidos por esses microrganismos no intestino, auxiliando em menores alterações das funções epiteliais, conseqüentemente gerando menos desordens digestivas ou diarreias (SAKOMURA et al., 2014).

Ácidos orgânicos também atuam positivamente no segmento intestinal dos frangos auxiliando na melhor digestão, absorção e retenção de nutrientes. No trato digestório auxiliam no tamponamento ácido do meio, especialmente no estômago, potencializando a ativação do pepsinogênio e reduzindo a taxa de esvaziamento gástrico. Conseqüentemente, aumenta-se o tempo de retenção do alimento no estômago, favorecendo maior absorção de nutrientes (MACHADO, 2007). Do mesmo modo que a acidificação do TGI aumenta as secreções do duodeno e pâncreas, melhorando a retenção de nitrogênio e aumentando a digestibilidade dos nutrientes da alimentação (SAKOMURA et al., 2014).

A ração fornecida às aves, mesmo sendo preparada com boas práticas e em locais adequados, pode ser contaminada por microrganismos patogênicos e deteriorantes. A aplicação de ácidos orgânicos favorece a conservação, age como flavorizante e retarda a degradação enzimática (ADAMS, 1999). A utilização dos ácidos orgânicos na nutrição animal já é permitida através da Instrução Normativa N° 44 de 15/12/2015, do MAPA, na qual ácidos orgânicos são classificados como aditivos acidificantes com função de reduzir o pH do trato digestivo superior para facilitar a digestão e contribuir para o equilíbrio da microbiota do trato digestório, tornando o meio menos favorável a bactérias patogênicas e mais susceptível ao desenvolvimento de bactérias benéficas.

Ácido propiônico, ácido láctico e ácido fórmico são os principais ácidos orgânicos empregados na alimentação de frangos (DIBNER & BUTTIN, 2002; FRESCHI, 2014; CALAÇA et al., 2019). Funari e colaboradores (2011) compararam o desempenho de frangos de corte alimentados com ração tratada com formulação composta por ácido láctico, propiônico e fórmico e antibióticos promotores de crescimento. Os autores observaram que frangos tratados com ácidos orgânicos obtiveram maior ganho de peso e ganho médio diário. Gonzáles et al. (2013) também compararam o desempenho de frangos tratados com ácidos orgânicos e antibióticos promotores de crescimento, os quais obtiveram ganhos de peso semelhantes entre os tratamentos, indicando que ácidos orgânicos são bons substitutos de APC.

O controle de bactérias patogênicas pelos ácidos orgânicos foi verificado por Simões (2015) que, ao aplicar ácido láctico, butírico e acético via água de bebida observou redução de aves contaminadas com *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Enteritidis. Pickler (2011) também aplicou ácidos orgânicos na dieta

de frangos e observou redução significativa de *Salmonella* Enteritidis no papo e ceco dos animais.

### 3.6 Docking molecular

As proteínas presentes nas estruturas dos microrganismos exercem importantes funções biológicas, pois interagem entre si e com outras moléculas ligantes, como fármacos e compostos químicos (LIU et al., 2016). Por essa razão, o estudo das interações que ocorrem entre proteína e ligante são fundamentais para escolha de moléculas que possuam potencial ao uso pretendido.

A avaliação da afinidade de ligação de moléculas com receptores pode ser realizada pelo método de docking molecular, um método *in silico* realizado por programa computacional, o qual identifica o comportamento de uma molécula dentro do sítio ativo de uma proteína, caracterizando a conformação e orientação do ligante no sítio e estimando a afinidade da ligação (MENG et al., 2011).

O método identifica as melhores formas de ligações entre o ligante e receptor, que é caracterizado em função de pontuação de energia, através das interações estéricas, eletrostáticas, ligações de hidrogênio e hidrofóbicas. Em razão disso, o programa é uma combinação de dois componentes: algoritmo de busca e função de pontuação (LORENZO, 2016). O algoritmo de busca verifica os possíveis modos de ligações entre o ligante e a proteína, enquanto a função de pontuação elege os modos de ligação teoricamente mais próximos ao modo de ligação real, classificando-os com os níveis de energia de interação (VERDONK et al., 2003). Planejar a utilização de moléculas baseada na estrutura e mecanismo de ação contribui para otimização do estudo (afinidade, especificidade e eficácia), possíveis efeitos sinérgicos com outras moléculas e redução de custos e tempo em experimentos *in vitro* (SILVA, 2008).

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Compostos estudados: óleos essenciais e ácidos orgânicos

No presente estudo foram utilizados os seguintes óleos essenciais: orégano (*Thymus capitatus*), cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), bem como os ácidos orgânicos: ácido propiônico, ácido láctico e ácido fórmico. Estes que foram adquiridos comercialmente em embalagem de 1 litro. Junto a estes foram disponibilizadas as fichas técnicas e fichas de emergência. A documentação foi avaliada quanto às propriedades físico-químicas, forma de extração (para óleos essenciais), fabricação e validade do produto.

Para cada OE, a forma de extração e parte da planta utilizada foi diferente. Para o óleo essencial de orégano, a extração ocorreu através da destilação gasosa das folhas de *Thymus capitatus*, já no Cravo-da-Índia foi realizada a partir da destilação a vapor das folhas de cravo de *Eugenia caryophyllata* e o óleo essencial de alecrim foi obtido por destilação da parte aérea seca de *Rosmarinus officinalis*. Tabela 1 com as propriedades físico-químicas dos compostos testados.

**Tabela 1.** Parâmetros físico-químicos dos compostos testados

| COMPOSTO         | ATIVO MAJORITÁRIO | MASSA ESPECÍFICA (g/mL) | TEOR (%) |
|------------------|-------------------|-------------------------|----------|
| Ácido Propiônico | Ácido Propiônico  | 0,995                   | 99,5     |
| Ácido Láctico    | Ácido Láctico     | 1,250                   | 84,5     |
| Ácido Fórmico    | Ácido Fórmico     | 1,200                   | 85,0     |
| Óleo de orégano  | Fenol             | 0,900                   | 60 a 75  |
|                  | $\beta$ -pineno   |                         | 5 a 10   |
| Óleo de alecrim  | bornan-2-ona      | 0,900                   | 10 a 20  |
|                  | $\alpha$ -Pineno  |                         | 10 a 20  |
|                  | Eucaliptol        |                         | >50      |
| Óleo de cravo    | Eugenol           | 1,040                   | 80 a 92  |
|                  | Beta-carofileno   |                         | 6 a 16   |

Os óleos essenciais e ácidos orgânicos foram alíquotados em embalagens estéreis para manter suas propriedades físico-químicas e microbiológicas durante o experimento. Além disso, os compostos foram mantidos sob refrigeração para conservação.

#### 4.2 Manutenção das bactérias testadas

Para avaliação dos ensaios microbiológicos foram testados no total 30 isolados provenientes de: cepas ATCC (7/30), suabe cloacal de frangos vivos antes do abate (13/30), isolados clínicos fornecidos pelo Centro de Diagnóstico e Pesquisa em Patologia Aviária (CDPA) – UFRGS (5/30) e isolados clínicos provenientes da bacterioteca do laboratório de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (DEMIP/ICBS UFRGS) (5/30). A origem dos microrganismos usados, esta descrita na Tabela 2.

Com a finalidade de manter as características morfológicas e genéticas, os microrganismos foram preservados por congelamento através do preparo de solução composta por leite e glicerol a 10%, mantidos a -20 °C.

**Tabela 2.** Microrganismos testados frente ao potencial antimicrobiano de óleos essenciais e ácidos orgânicos

| MICROORGANISMO                            | ORIGEM DO ISOLADO |
|---|-------------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i>             | ATCC 7644         |
| <i>Listeria monocytogenes</i>             | ATCC 35152        |
| <i>Staphylococcus aureus</i>              | ATCC 29213        |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium             | ATCC 14028        |
| <i>Enterococcus faecalis</i>              | ATCC 51299        |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis             | ATCC 13076        |
| <i>Escherichia coli</i>                   | ATCC 10536        |
| <i>Enterobacter cloacae</i>               | Amostra clínica   |
| <i>Escherichia coli</i> CMY2 AMPC+        | Amostra clínica   |
| <i>Escherichia coli</i> Polivalente B     | Amostra clínica   |
| <i>Escherichia coli</i> EPC01 111         | Amostra clínica   |
| <i>Escherichia coli</i> Polivalente A     | Amostra clínica   |
| <i>Escherichia coli</i> (SL7 - Lote 2)    | Suabe cloacal     |
| <i>Escherichia coli</i> (SL26 - Lote 1)   | Suabe cloacal     |
| <i>Escherichia coli</i> (SL 80 - Lote 5)  | Suabe cloacal     |
| <i>Escherichia coli</i> (SL 132 - Lote 8) | Suabe cloacal     |

|  |                    |
|--|--------------------|
| <i>Escherichia coli</i> (SL 154 - Lote 9)  | Suabe cloacal      |
| <i>Escherichia coli</i> (SL 236 - Lote 12) | Suabe cloacal      |
| <i>Escherichia coli</i> (SL 239 - Lote 13) | Suabe cloacal      |
| <i>Escherichia coli</i> (SL 240 - Lote 13) | Suabe cloacal      |
| <i>Escherichia coli</i> (SL 241 - Lote 13) | Suabe cloacal      |
| <i>Escherichia coli</i> (SL 318 - Lote 17) | Suabe cloacal      |
| <i>Escherichia coli</i> (SL 334 - Lote 18) | Suabe cloacal      |
| <i>Escherichia coli</i> (SL 175 - Lote 10) | Suabe cloacal      |
| <i>Escherichia coli</i> (SL 247 - Lote 14) | Suabe cloacal      |
| <i>Escherichia coli</i> APEC 6             | Lesão com celulite |
| <i>Escherichia coli</i> APEC 7             | Lesão com celulite |
| <i>Pasteurella multocida</i>               | Cólera aviária     |
| <i>Salmonella Gallinarum</i> - SG26        | Tifo aviário       |
| <i>Salmonella Gallinarum</i> - SG101       | Tifo aviário       |

#### 4.2.1 Padronização dos microrganismos testados

Os microrganismos testados foram descongelados em temperatura ambiente e repassados para tubos contendo caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), marca Kasvi. Os mesmos foram incubados a 37° por 24 horas. Após a incubação, foi avaliada a presença ou ausência de turvação do meio, sendo que os tubos contendo meio turvo foram inoculados em ágar BHI (Kasvi) com objetivo de avaliar a pureza e viabilidade das colônias.

Para padronização dos inóculos foram adicionadas colônias puras obtidas no ágar BHI em solução salina 0,85% estéril até turbidez comparável à solução padrão 0.5 de McFarland, que corresponde à  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL.

#### 4.3 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e ácidos orgânicos testados isoladamente frente às bactérias

A avaliação da sensibilidade dos microrganismos frente aos óleos essenciais e ácidos orgânicos foi conduzida com os compostos puros, nas concentrações apresentadas na Tabela 1. O teste foi realizado conforme as normas do *Clinical & Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2003) com modificações por Karaman et al. (2003).

Após a preparação do inóculo, conforme item 4.2.1, com auxílio de um suabe estéril a suspensão foi inoculada em toda a superfície da placa de petri

contendo meio de cultura Ágar Muller Hinton (AMH). Posteriormente foi adicionado sobre a superfície do meio de cultura, 10 µL de cada óleo essencial e ácido orgânico individualmente, na forma de gota e aguardou-se a total difusão do composto para levar a incubação. Conduziu-se o teste de atividade antimicrobiana também para o composto puro Tween 80, em virtude da necessidade de utilizá-lo como emulsificante nas formulações propostas.

As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37°C por 24 horas, posteriormente foi realizada a leitura dos halos de inibição, e os resultados foram expressos em milímetros (mm). O teste foi conduzido em triplicata.

#### 4.4 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais e ácidos orgânicos testados isoladamente frente às bactérias indicadoras

A partir dos resultados encontrados no item 4.3, os testes de concentração inibitória mínima foram conduzidos apenas para os compostos que obtiveram efeito antimicrobiano. As concentrações testadas de cada composto estão descritas na tabela 3.

**Tabela 3.** Concentração dos compostos selecionados para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) após triagem pelo teste de atividade antimicrobiana

| COMPOSTO                         | CONCENTRAÇÃO (mg/mL) |
|----------------------------------|----------------------|
| Ácido propiônico                 | 29,85 à 0,39         |
| Ácido láctico                    | 31,68 à 0,42         |
| Ácido fórmico                    | 30,6 à 0,40          |
| Óleo essencial de cravo-da-índia | 104 à 1,62           |
| Óleo essencial de alecrim        | 90 à 1,40            |

Doze isolados foram selecionados para serem testados a partir dos seguintes critérios: um microrganismo de cada gênero, uma ATCC de cada espécie que apresentou maior sensibilidade no experimento 4.3, um isolado de suabe cloacal mais sensível aos compostos, um isolado de lesão com celulite mais sensível aos compostos e um isolado de tifo aviário mais sensível aos compostos (Tabela 4).

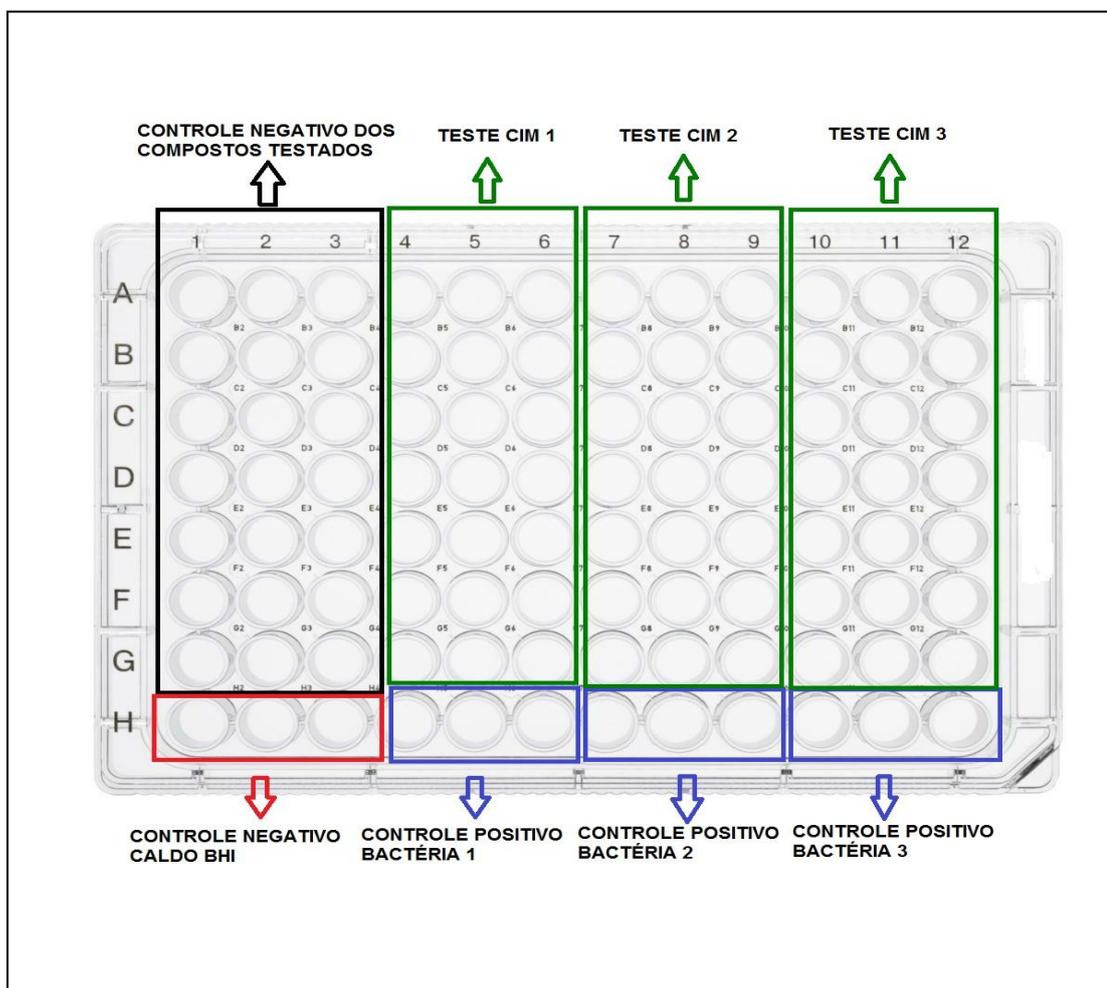
**Tabela 4.** Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais e ácidos orgânicos: microrganismos e respectiva origem dos isolados selecionados

| MICROORGANISMO                             | ORIGEM DO ISOLADO  |
|--|--------------------|
| <i>Listeria monocytogenes</i>              | ATCC 7644          |
| <i>Staphylococcus aureus</i>               | ATCC 29213         |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium              | ATCC 14028         |
| <i>Enterococcus faecalis</i>               | ATCC 51299         |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis              | ATCC 13076         |
| <i>Escherichia coli</i>                    | ATCC 10536         |
| <i>Enterobacter cloacae</i>                | Amostra clínica    |
| <i>Escherichia coli</i> EPC01 111          | Amostra clínica    |
| <i>Escherichia coli</i> (SL 175 - Lote 10) | Suabe cloacal      |
| <i>Escherichia coli</i> APEC 6             | Lesão com celulite |
| <i>Pasteurella multocida</i>               | Cólera aviária     |
| <i>Salmonella</i> Gallinarum- SG101        | Tifo aviário       |

Para a determinação da CIM dos compostos, realizou-se o método de microdiluição em caldo, conforme metodologia descrita pelo *Clinical & Laboratory Standards Institute* (2003), esquematizado conforme a figura 1.

A concentração inicial dos óleos essenciais e ácidos orgânicos foi preparada diluindo-se os compostos em caldo BHI e emulsionando-se em 1% de Tween 80. Em cada placa de 96 poços, foi adicionado 200 µL da solução inicial dos compostos na fileira A e 100 µL de caldo BHI nas fileiras B a H. Posteriormente foram realizadas as diluições seriadas nos poços pipetando-se 100 µL em cada linha proveniente da coluna anterior. Em seguida foi adicionado em cada poço 5 µL de solução de microrganismos preparados conforme item 4.2.1. Todos os testes foram realizados em triplicata. Foi adicionado o controle positivo das bactérias na linha H, nas colunas 4 a 12, adicionando-se 200 µL de caldo e 5 µL de inóculo bacteriano. O controle negativo do caldo BHI foi adicionado nos poços H1, H2 e H3, adicionando-se apenas 200 µL de caldo. Os controles negativos dos óleos essenciais e dos ácidos orgânicos para todas as diluições foram adicionados nos poços das linhas A a G e das colunas 1, 2 e 3, adicionando-se apenas as diluições. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

**Figura 1.** Representação placa de 96 poços para determinação da CIM pelo método de microdiluição.



#### 4.5 Determinação da Concentração bactericida mínima (CBM)

A partir dos resultados encontrados na CIM, alíquotas de 10  $\mu$ L dos poços que não apresentaram crescimento microbiano foram semeadas em placas de Petri contendo ágar BHI e incubados a 37 °C por 24 horas. A concentração bactericida mínima foi considerada na diluição que não houve crescimento de unidades formadoras de colônia no meio de cultura (SANTURIO et al., 2007).

#### 4.6 Teste de sinergismo pelo método de *checkerboard*

Com base nos resultados encontrados no experimento 4.4, os compostos que obtiveram a menor CIM e CBM, OE de cravo-da-índia e ácido fórmico foram associados a fim de verificar o efeito sinérgico através do método de *checkerboard* descrito por Freire (2018). O experimento foi realizado com os microrganismos descritos na Tabela 5. Os mesmos foram escolhidos devido à importância que apresentam para cadeia avícola.

**Tabela 5.** Microrganismos empregados no teste de sinergismo pelo método de *checkerboard*.

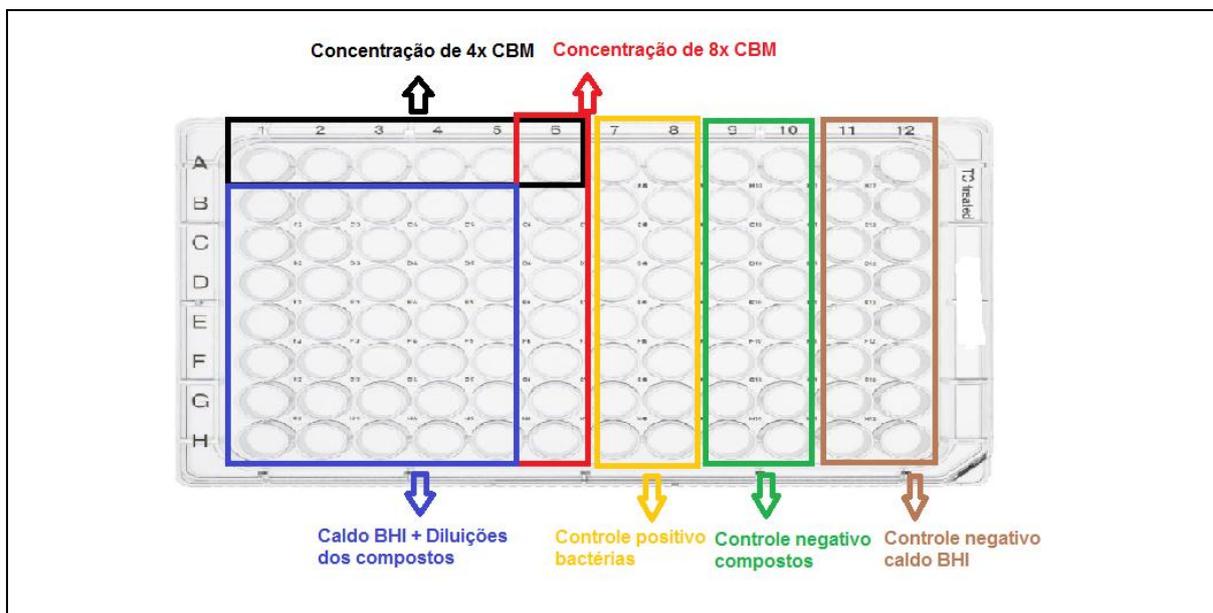
| MICROORGANISMO                      | ORIGEM DO ISOLADO  | IMPORTÂNCIA                     |
|-------------------------------------|--------------------|---------------------------------|
| <i>Salmonella</i> Typhimurium       | ATCC 14028         | Notificação obrigatória ao PNSA |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis       | ATCC 13076         | Notificação obrigatória ao PNSA |
| <i>Escherichia coli</i> APEC 6      | Lesão com celulite | Recorrente em doenças em aves   |
| <i>Salmonella</i> Gallinarum- SG101 | Tifo aviário       | Notificação obrigatória ao PNSA |

PNSA: Programa Nacional de Sanidade Avícola (MAPA)

Em uma microplaca de 96 poços foi adicionado 100 µL de caldo BHI em todos os poços da coluna 1 a 6. Posteriormente, na coluna 6 adicionou-se 100 µL do óleo essencial de cravo-da-índia, na concentração de 8x o valor da CBM e realizou-se uma diluição seriada, transferindo sequencialmente 100 µL do volume do poço no sentido horizontal até a coluna 1. Na linha A, adicionou-se 100 µL de ácido fórmico, na concentração de 4x o valor da CBM e diluiu-se seriadamente, transferindo sequencialmente 100 µL do volume do poço, no sentido vertical até a linha H. Adicionou-se em cada poço 5 µL da suspensão bacteriana padronizada conforme descrito no item 4.2.1 (Figura 2).

Em todos os poços da linha 7 e linha 8 foi adicionada a suspensão bacteriana, juntamente com o meio BHI, para controle positivo de viabilidade bacteriana. Nos poços da linha 9 e 10 foram adicionados os compostos estudados para controle negativo. E na linha 11 e 12 apenas o meio BHI, como controle de esterilidade. As microplacas foram incubadas por 24 horas a 37 °C.

**Figura 2.** Representação placa de 96 poços para determinação de sinergismo pelo método de *checkerboard*.



Posterior à incubação, o conteúdo dos poços que não apresentaram crescimento foi inoculado em placas contendo ágar BHI e incubado novamente por 24 horas a 37 °C. A interpretação do efeito sinérgico de cada antimicrobiano e das combinações foi determinada pelo cálculo do Índice da Fração Inibitória (IFI), por meio da seguinte fórmula:

$$\text{IFI do óleo essencial de cravo-da-índia: } \frac{\text{CBM combinado}}{\text{CBM do óleo sozinho}}$$

$$\text{IFI do ácido fórmico: } \frac{\text{CBM combinado}}{\text{CBM do ácido sozinho}}$$

$$\Sigma \text{IFI: IFI óleo} + \text{IFI ácido}$$

A somatória dos IFIs foi utilizada para a classificação dos efeitos: Ação sinérgica ( $\text{IFI} \leq 0,5$ ); Aditiva ( $0,5 < \text{IFI} \leq 1$ ); Indiferente ( $1 < \text{IFI} < 2$ ); Antagônica ( $\text{IFI} \geq 2$ ) (LEE; JANG; CHA, 2012).

#### 4.7 Cinética de inativação bacteriana

Foi determinado o tempo de contato mínimo necessário para inativação bacteriana pelo método descrito por MOTTA et al., (2007), através de contagem de células viáveis. Os microrganismos testados, *Escherichia coli* APEC e *Salmonella* Gallinarum, foram escolhidos devido a sua importância para cadeia avícola e por serem isolados de surtos.

Os microrganismos foram cultivados individualmente em caldo BHI a 37° por 24 horas. A concentração dos compostos testados foi estabelecida conforme experimento de *Checkerboard*, onde a associação que possuía menor concentração de ativos frente aos dois microrganismos a serem testados foi escolhida (Óleo essencial de Cravo-da-índia: 1,63 mg/mL e Ácido fórmico: 0,03 mg/mL).

Em um erlenmeyer, o inóculo inicial das bactérias foi padronizado na diluição de  $1,0 \times 10^7$  UFC/mL, através da verificação por contagem em ágar PCA, após incubação a 37 °C por 24 horas. Alíquotas de 1 mL do inóculo padronizado foram pipetadas em tubos estéreis para avaliação do grupo controle, sem adição dos compostos. Nos tubos testes foram acrescentados, 1 mL de solução padronizada na concentração a ser testada e 50 uL de inóculo.

Os tubos foram incubados a 37° e alíquotas foram retiradas para realização de diluição seriada nos intervalos de 0, 20, 60 e 120 minutos. De cada diluição foi realizado plaqueamento de 20 uL em ágar Plate Count Ágar (PCA) em triplicata, incubando a 37°C por 48 horas. Após este período, realizou-se as contagens de número de UFC/mL. O experimento foi conduzido em duplicata, a fim de confirmar os achados, e as contagens em cada experimento foram conduzidas em triplicata, sendo os resultados expressos em log UFC/mL.

#### 4.8 Análise da atividade antioxidante dos compostos testados

Para avaliação da atividade antioxidante foi empregada a técnica de captura do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila), conforme descrito por Kondo et al. (2002), Souza et al. (2007) e Boroski et al. (2015). Nesta, o potencial antioxidante da amostra é analisado através do descoloramento da solução de DPPH, púrpura para amarelo, monitorado por espectrofotometria. Os testes foram conduzidos individualmente para cada óleo essencial e ácido orgânico. Posteriormente, os compostos ácido fórmico e óleo essencial de cravo-da-índia

foram associados nas concentrações testadas na curva de morte, a fim de verificar o potencial antioxidante dos compostos associados. Com finalidade comparativa, foram testados os antioxidantes sintéticos Hidroxitolueno butilado (BHT) e Hidroxianisol butilado (BHA), que são amplamente utilizados pela indústria.

Foi preparado ao abrigo de luz uma solução de DPPH a 0,0621 mmolL<sup>-1</sup> em metanol, utilizada apenas no dia de sua preparação. Os compostos foram analisados em diversas concentrações, a fim de estabelecer uma curva de porcentagem de inibição do radical livre em função da concentração dos óleos.

Os produtos não foram testados em concentrações similares, devido sua capacidade antioxidante ser diferente e conseqüentemente, necessitando de concentrações distintas para o objetivo proposto. Tabela 6 foram apresentadas as concentrações testadas para cada composto.

**Tabela 6.** Concentrações testadas de cada composto para avaliação do poder antioxidante.

|  | OE<br>cravo | OE<br>orégano | OE<br>alecrim | BHT | BHA  | Ácido<br>lático | Ácido<br>fórmico | Ácido<br>propiónico | Associação |
|--|-------------|---------------|---------------|-----|------|-----------------|------------------|---------------------|------------|
| <b>Concentrações<br/>testadas (mg/L)</b> | 0,5         | 500           | 250           | 10  | 0,25 | 1000            | 1000             | 50                  | 50         |
|  | 0,75        | 750           | 500           | 20  | 0,5  | 2500            | 2500             | 75                  | 75         |
|  | 1,00        | 1000          | 1000          | 30  | 0,75 | 5000            | 5000             | 100                 | 100        |
|  | 2,00        | 2500          | 2000          | 40  | 1,0  | 7500            | 7500             | 200                 | 200        |
|  | 3,00        | 5000          | 3000          | 50  | 2,0  | 10000           | 10000            | 300                 | 300        |
|  | 4,00        | 7500          | 4000          | 75  | 3,0  | -               | -                | 400                 | 400        |
|  | 5,00        | 10000         | 5000          | 100 | 4,0  | -               | -                | 500                 | 500        |

Os volumes de cada composto foram pipetados em tubos tipo falcon, em triplicatas. Ao abrigo de luz foi adicionado 2 mL da solução metanólica de DPPH e aguardado 30 minutos para realizar as leituras em espectrofotômetro UV/VIS a 517 nm contra o branco (metanol). Também foram realizadas análises da absorbância da solução metanólica de DPPH.

Para determinação dos resultados foi estimado a concentração de antioxidante necessário para inibir 50% do radical DPPH (IC<sub>50</sub>) por meio da equação:

$$\% \text{ Inibição DPPH} = \frac{(\text{Abs}_{\text{DPPH}} - \text{Abs}_{\text{amostra}})}{\text{Abs}_{\text{DPPH}}} \times 100$$

Abs<sub>DPPH</sub>

Onde:

Abs<sub>DPPH</sub>: absorvância da solução metanólica do radical DPPH;

Abs<sub>amostra</sub>: absorvância da amostra após reação com a solução de DPPH;

Posteriormente, plotou-se uma curva para cada composto com valores da porcentagem de inibição do DPPH em função da concentração do ativo. Desta forma, através de regressão linear os valores de IC<sub>50</sub> foram obtidos.

Após obtenção do IC<sub>50</sub>, foram calculados os índices da atividade antioxidante (AAI) conforme proposto por Scherer e Godoy (2009), para avaliação da eficiência do poder antioxidante:

$$AAI = \frac{[DPPH]_{final} (\mu\text{g mL}^{-1})}{IC_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})}$$

Onde:

[DPPH]<sub>final</sub>: concentração final da solução metanólica de DPPH

IC<sub>50</sub> a concentração do antioxidante necessário para inibir 50% do radical DPPH.

Os resultados encontrados foram avaliados conforme a Tabela 7, onde os autores Scherer e Godoy (2009) propuseram a classificação do potencial antioxidante para extratos vegetais.

**Tabela 7.** Descrição do potencial antioxidante de acordo com o índice de atividade antioxidante (AAI)

| AAI       | CAPACIDADE ANTIOXIDANTE |
|-----------|-------------------------|
| < 0,5     | Fraco                   |
| 0,5 a 1,0 | Moderado                |
| 1,0 a 2,0 | Forte                   |
| > 2,0     | Muito forte             |

Scherer e Godoy (2009)

#### 4.9 Docking molecular

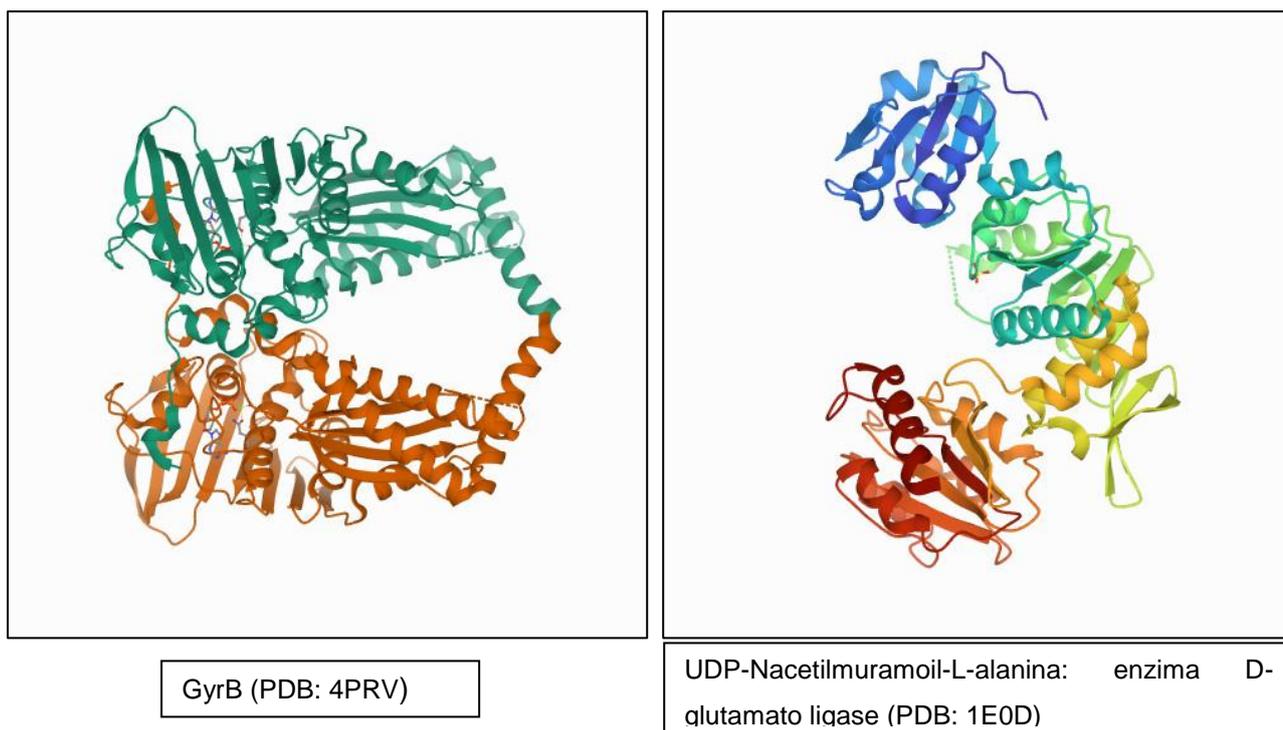
As moléculas das substâncias ácido fórmico, ácido propiônico, ácido láctico e moléculas majoritárias de OE de cravo-da-índia, OE de alecrim e OE de orégano foram desenhadas através da extensão do MarvinSketch, parte do pacote JChem da ChemAxon (<https://www.chemaxon.com/>). Foi avaliado como controle o antibiótico Ciprofloxacina, utilizado na avicultura para controle de

patógenos, conforme autorizado pela Instrução normativa nº 26 de 2009 (BRASIL, 2009).

Para realização do docking molecular foram escolhidas as proteínas UDP-Nacetilmuramoil-L-alanina: enzima D-glutamato ligase (PDB: 1E0D), responsável pela biossíntese intracelular de peptidoglicano e GyrB (PDB: 4PRV), responsável pela hidrólise de ATP para que o superenrolamento do DNA aconteça. As proteínas foram classificadas como alvos interessantes pois estão localizadas no citoplasma bacteriano. Estas proteínas são encontradas tanto nos gêneros *Salmonella* quanto *Escherichia coli* e não estão presentes no genoma de aves.

As estruturas foram obtidas no Protein Data Bank (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) (Figura 3).

**Figura 3.** Estrutura das proteínas selecionadas para estudo proveniente do Protein Data Bank.



A energia de ligação entre as moléculas e as proteínas foi calculada conforme a configuração de padronização. O encaixe molecular foi realizado utilizando o Molegro Virtual Docker (MolDock), v. 6.0.1 (MVD). Inicialmente, todas as moléculas de água foram excluídas das estruturas das proteínas e dos compostos que foram preparadas usando as mesmas configurações padrão dos parâmetros no pacote de software (função de pontuação: pontuação MolDock;

avaliação de ligantes: ES interno, HBond interno, torções Sp2-Sp2, todos verificados; número de execuções: 10; algoritmo de busca: MolDock SE; interações máximas: 1500; tamanho máximo da população: 50; passos máximos: 300; fator de distância do vizinho: 1,00; e número máximo de poses retornadas: 5). O procedimento de acoplamento foi realizado utilizando uma GRID de 10Å de raio e 0,20 de resolução para cobrir o local de ligação ao ligante da estrutura em questão (TAVARES et al., 2020).

#### 4.10 Estatística

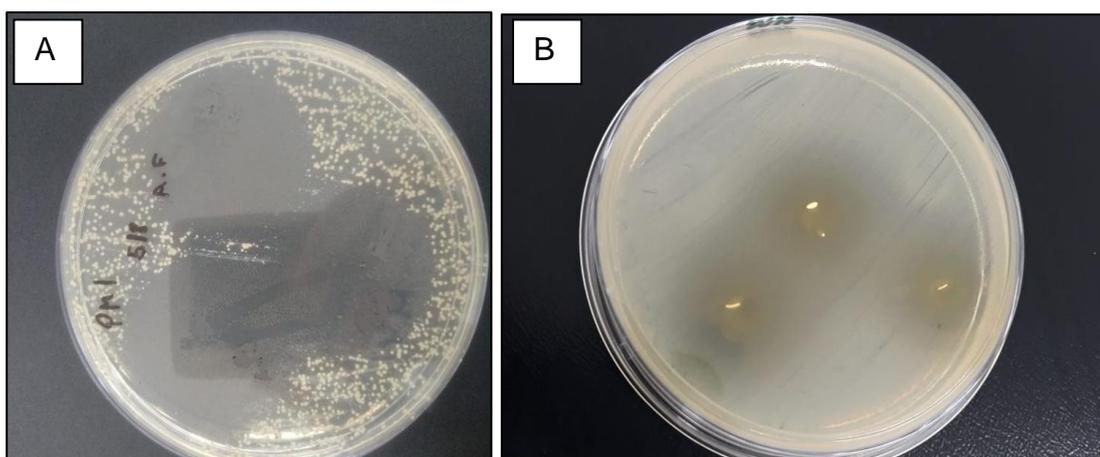
Para todas as variáveis avaliadas, inicialmente, foi verificada a normalidade e homogeneidade dos resíduos. As variáveis de MIC, CMB e halos de inibição foram analisados através do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis com nível de significância de 5% e, quando verificada diferença significativa, foi realizado o teste de comparações múltiplas Dwass, Steel, Critchlow-Fligner. Para a variável IC50 foi realizada análise de variância e o teste de comparação de médias de Tukey, com nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ). Para isso, foram utilizados os procedimentos UNIVARIATE, NPAR1WAY e GLM do software estatístico SAS (CODY, 2015).

## 5. RESULTADOS

### 5.1 Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais e ácidos orgânicos testados isoladamente frente às bactérias estudadas

Através da leitura dos halos de inibição, foi verificado que os ácidos orgânicos apresentaram atividade antimicrobiana frente aos 30 isolados testados. O ácido fórmico apresentou a maior média de halo, com 32,09 mm (Figura 4A), seguido pelo ácido propiônico, com média de 27,05 mm, e ácido láctico com diâmetro médio de 21,19 mm.

Avaliou-se que houve atividade antimicrobiana do óleo essencial de cravo-da-índia frente a 93,33% dos isolados testados (28 isolados), com média de leitura de 14,36 mm (Figura 4B). Não foi observada efetividade do composto frente à *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* (isolado de suabe cloacal) (Tabela 8).

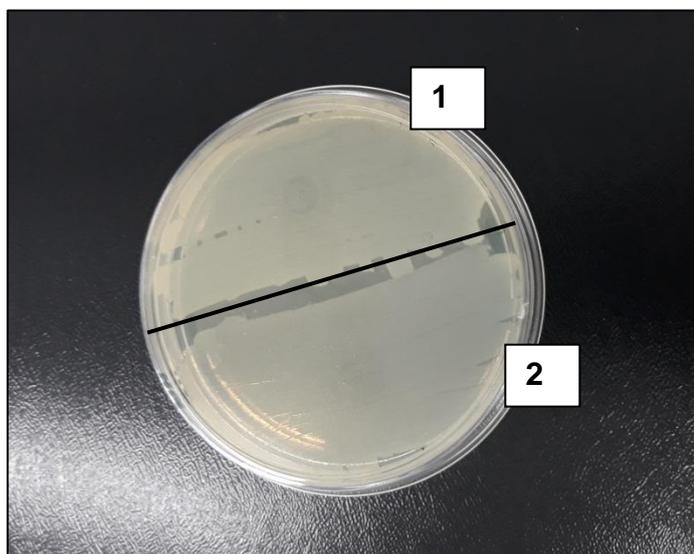


**Figura 4.** Atividade antimicrobiana dos compostos testados pelo método de disco difusão. As imagens ilustram os halos de inibição gerados pelo ácido fórmico (A) frente à *Escherichia coli* isolada de suabe cloacal e pelo óleo essencial de Cravo-da-índia (B) frente à *Escherichia coli* APEC isolada de lesão com celulite.

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim foi verificada frente a 90% isolados testados (27/30). Três isolados de *Escherichia coli* provenientes da cloaca de frangos antes do abate apresentaram resistência ao composto. A média de halos de inibição foi de 9,42 mm.

O óleo essencial de orégano apresentou atividade antimicrobiana para 6,67% (2/30) dos isolados testados. Somente houve atividade antimicrobiana frente ao *S. aureus* ATCC 29213 e *E. faecalis* ATCC 51299, com formação média

de halo de inibição de 0,88 mm. Já o emulsificante Tween 80, utilizado para diluição dos óleos nos meios de cultura e nas associações dos compostos, não apresentou poder antimicrobiano, conforme demonstrado na figura 5.



**Figura 5.** Ilustração da verificação de potencial antimicrobiano do emulsificante Tween 80 frente à *Salmonella Gallinarum* (1) e *Escherichia coli* APEC (2) isoladas de surtos. Não foi avaliado halos de inibição frente aos microrganismos testados.

**Tabela 8.** Resultados das médias de leituras de halos gerados por óleos essenciais e ácidos orgânicos frente aos 30 isolados testados. Valores de média e mediana expressos em mm.

| Compostos isolados   | Média ( $\pm$ EP) | Mediana*           | IC (95%)    | p-valor<br>Kruskal-Wallis Test |
|----------------------|-------------------|--------------------|-------------|--------------------------------|
| Ácido Fórmico        | 32,09 $\pm$ 1,01  | 31,00 <sup>A</sup> | 22,0 - 52,0 |                                |
| Ácido Propiônico     | 27,05 $\pm$ 0,93  | 28,00 <sup>B</sup> | 15,0 - 40,0 |                                |
| Ácido Lático         | 21,19 $\pm$ 0,45  | 21,00 <sup>C</sup> | 15,0 - 31,0 |                                |
| OE de Cravo-da-índia | 14,36 $\pm$ 0,54  | 15,00 <sup>D</sup> | 21,0 - 0,0  | <.0001                         |
| OE de Alecrim        | 9,42 $\pm$ 0,44   | 9,00 <sup>E</sup>  | 16,0 - 0,0  |                                |
| OE de Orégano        | 0,88 $\pm$ 0,36   | 0,00 <sup>F</sup>  | 0,0 - 9,0   |                                |

EP: Erro padrão; IC: Intervalo de credibilidade de 95%.

\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

## 5.2 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) dos óleos essenciais e ácidos orgânicos testados isoladamente frente às bactérias indicadoras

Os resultados da CIM para os doze isolados selecionados (Tabela 4), conforme critérios descritos no item 4.4, estão expressos na Tabela 9. O óleo essencial de orégano não foi avaliado, visto que apresentou atividade antimicrobiana apenas para dois microrganismos, *Staphylococcus aureus* ATCC 29213 e *Enterococcus faecalis* ATCC 51299.

Observou-se que o ácido fórmico obteve concentração média de 1,58 mg/mL capaz de inibir o crescimento bacteriano, seguido do ácido propiônico (2,48 mg/mL) e ácido lático (4,45 mg/mL).

Dentre os compostos naturais, a concentração de óleo essencial de cravo-da-índia necessária para efeito inibitório foi de 7,99 mg/mL, estatisticamente semelhante ao ácido lático. Verificou-se que a CIM do óleo essencial de alecrim obteve concentração média de 35,86 mg/mL ( $p > 0,05$ ), significativamente a maior ( $p < 0,05$ ) concentração necessária dentre os compostos testados.

**Tabela 9.** Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais e ácidos orgânicos testados isoladamente frente às 12 bactérias selecionadas. Resultados de média e mediana expressos em mg/mL.

| Compostos isolados   | Média ( $\pm$ EP) | Mediana*           | IC (95%)     | p-valor<br>Kruskal-Wallis<br>Test |
|----------------------|-------------------|--------------------|--------------|-----------------------------------|
| OE de Alecrim        | 35,86 (4.17)      | 45,00 <sup>A</sup> | 22,5 – 45,0  |                                   |
| OE de Cravo-da-Índia | 7,99 (1.93)       | 6,50 <sup>B</sup>  | 3,24 – 13,00 |                                   |
| Ácido Fórmico        | 1,58 (0.14)       | 1,90 <sup>C</sup>  | 0,95 – 1,90  | <.0001                            |
| Ácido Lático         | 4,45 (0.50)       | 3,96 <sup>B</sup>  | 3,96 – 3,96  |                                   |
| Ácido Propiônico     | 2,48 (0.27)       | 1,86 <sup>C</sup>  | 1,86 – 3,73  |                                   |

EP: Erro padrão; IC: Intervalo de credibilidade de 95%.

\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

Os controles negativos dos compostos testados e do caldo BHI não apresentaram crescimento microbiano. Através dos controles positivos, verificou-se a viabilidade dos microrganismos.

### 5.3 Determinação da Concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais e ácidos orgânicos testados isoladamente frente às bactérias indicadoras

A partir dos resultados encontrados na CIM, a CBM dos compostos foi verificada frente aos 12 isolados selecionados (Tabela 4). Avaliou-se que dentre os ácidos orgânicos, o ácido fórmico obteve significativamente ( $p < 0,05$ ) a menor concentração bactericida, com média de 2,38 mg/mL, seguido pelos ácidos propiônico (9,14 mg/mL) e láctico (9,73 mg/mL), que não diferiram significativamente entre si ( $p > 0,05$ ).

Dentre os óleos essenciais, o cravo-da-Índia obteve CBM de 12,32 mg/mL, divergente da atividade apresentada pelo alecrim, que significativamente necessitou da maior concentração para efeito bactericida mínimo (Tabela 10).

**Tabela 10.** Resultado da Concentração Bactericida Mínima dos óleos essenciais e ácidos orgânicos testados frente aos doze isolados bacterianos. Resultados de média e mediana expressos em mg/mL.

| Compostos isolados   | Média ( $\pm$ EP) | Mediana*           | IC (95%)     | p-valor<br>Kruskal-Wallis<br>Test |
|----------------------|-------------------|--------------------|--------------|-----------------------------------|
| OE de Alecrim        | 70,06 (8.95)      | 90,00 <sup>A</sup> | 45,00 - 90   |                                   |
| OE de Cravo-da-Índia | 12,32 (4.05)      | 6,50 <sup>B</sup>  | 6,50 – 13,0  |                                   |
| Ácido Fórmico        | 2,38 (0.25)       | 1,90 <sup>C</sup>  | 1,90 – 3,82  | <.0001                            |
| Ácido Láctico        | 9,73 (1.41)       | 7,92 <sup>B</sup>  | 7,92 – 15,84 |                                   |
| Ácido Propiônico     | 9,14 (1.38)       | 7,46 <sup>B</sup>  | 7,46 – 14,92 |                                   |

EP: Erro padrão; IC: Intervalo de credibilidade de 95%

\*Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4 Determinação de sinergismo entre ácido fórmico e óleo essencial de cravo-da-índia pelo método de *checkerboard*

De acordo com o critério de interpretação da atividade sinérgica pelo método de *checkerboard*, obtiveram-se resultados sinérgicos frente a 3 microrganismos testados e um efeito aditivo frente a 1 isolado, a partir da associação entre OE de cravo-da-índia e ácido fórmico (Tabela 11).

O efeito sinérgico foi observado para *Salmonella* Typhimurium ( $\Sigma$ IFI 0,37), *Salmonella* Enteritidis ( $\Sigma$ IFI 0,07) e *Escherichia coli* APEC ( $\Sigma$ IFI 0,265), demonstrando que o efeito dos compostos associados é superior ao efeito individual. Para o isolado de *Salmonella* Gallinarum ( $\Sigma$ IFI 0,515), o resultado da associação foi aditivo. Neste caso, o efeito final é igual à soma dos efeitos isolados, também sendo um resultado importante, visto que diminuiu-se a concentração dos compostos necessários para efeito bactericida.

A associação sinérgica com as menores concentrações de ativos foi avaliada frente à *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), em que houve uma redução de 99,21% de ácido fórmico e 93,76% de OE de Cravo-da-índia para obtenção do efeito bactericida, ao comparar ao efeito individual dos compostos.

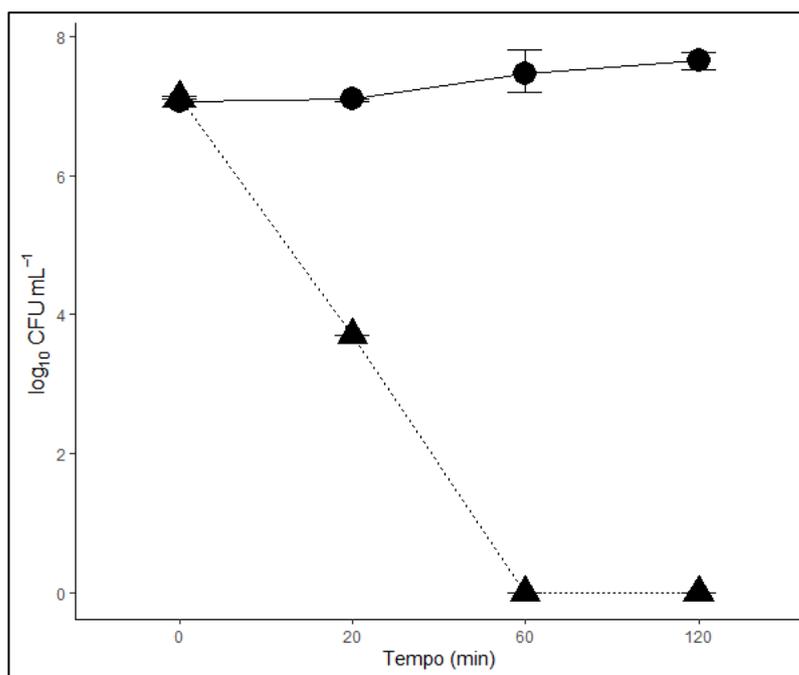
**Tabela 11.** Resultados da associação de ácido fórmico e óleo essencial de cravo-da-índia frente à *Salmonella* Gallinarum, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Escherichia coli* APEC pelo método de *Checkerboard*.

| Isolado                                     | Composto          | CBM (mg/mL) |           | $\Sigma$ FIC | Resultado |
|---|-------------------|-------------|-----------|--------------|-----------|
|   |                   | Individual  | Associado |              |           |
| <i>Salmonella</i> Typhimurium<br>ATCC 14028 | Ácido Fórmico     | 3,82        | 0,95      | 0,375        | Sinérgico |
|   | OE Cravo-da-índia | 6,5         | 0,81      |              |           |
| <i>Salmonella</i> Enteritidis<br>ATCC 13076 | Ácido Fórmico     | 1,9         | 0,015     | 0,07         | Sinérgico |
|   | OE Cravo-da-índia | 13          | 0,81      |              |           |
| <i>Escherichia coli</i> APEC                | Ácido Fórmico     | 1,9         | 0,03      | 0,265        | Sinérgico |
|   | OE Cravo-da-índia | 6,5         | 1,63      |              |           |
| <i>Salmonella</i> Gallinarum                | Ácido Fórmico     | 1,9         | 0,029     | 0,515        | Aditivo   |
|   | OE Cravo-da-índia | 3,24        | 1,62      |              |           |

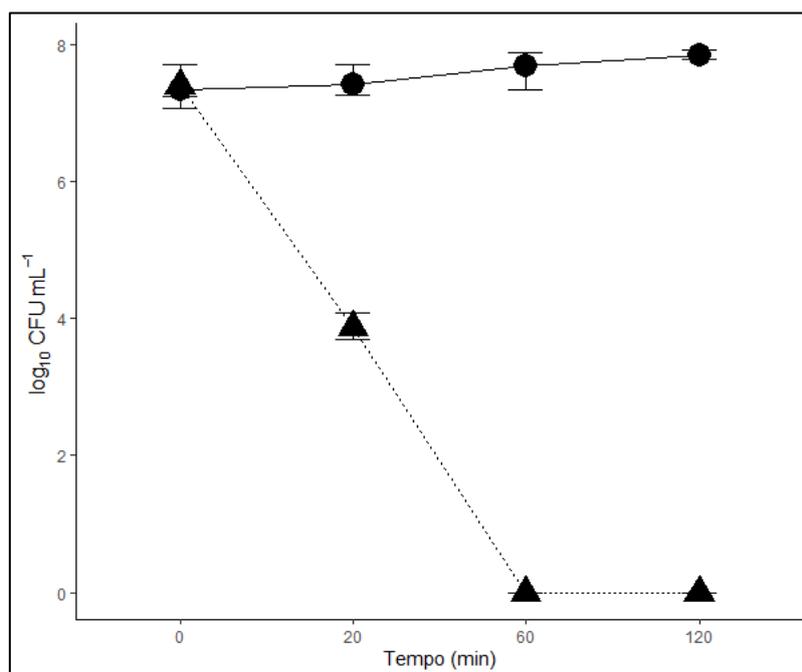
### 5.5 Determinação da cinética de inativação de *Escherichia coli* APEC e *Salmonella* Gallinarum frente aos compostos ácido fórmico e óleo essencial de cravo-da-índia

A partir das concentrações sinérgicas encontradas no teste de *Chekerboard*, a cinética de inativação foi avaliada frente aos dois isolados de campo: *Escherichia coli* APEC e *Salmonella* Gallinarum. As curvas de inativação frente a cada microrganismo estão ilustradas nas Figura 06 e Figura 07, expressas em  $\log_{10}\text{UFCmL}^{-1}$  em função do tempo, na ausência dos compostos e exposição aos mesmos.

Os resultados demonstraram que houve um efeito bactericida para ambos os microrganismos a partir dos 60 minutos de contato com os compostos testados. Em contra partida, os controles mantiveram-se viáveis durante as 2 horas de acompanhamento da cinética celular.



**Figura 06.** Cinética de inativação celular de *Salmonella* Gallinarum frente à associação entre OE de Cravo-da-índia e ácido fórmico. Controle positivo representado em círculos e tratamento representado por triângulos. Cada ponto representa a média de teste conduzido em triplicata.



**Figura 07.** Cinética de inativação celular de *Escherichia coli* APEC frente à associação entre OE de Cravo-da-índia e ácido fórmico. Controle positivo representado em círculos e tratamento representado por triângulos. Cada ponto representa a média de teste conduzido em triplicata.

#### 5.6 Estudo por meio de Docking molecular do potencial de óleos essenciais e ácidos orgânicos na inibição de *Salmonella* e *Escherichia coli*

As moléculas dos ácidos orgânicos e óleos essenciais foram incorporadas às estruturas UDP-Nacetilmuramoil-L-alanina: enzima D-glutamato ligase, responsável pela sintetização intracelular de peptidoglicano, e GyrB, envolvida no processo de superenrolamento do DNA. Ambas as proteínas estão presentes em *Salmonella* e *E. coli*. Os resultados de energia de ligação necessária para interação entre os compostos e as proteínas estão representados na Tabela 13.

Para a proteína UDP-Nacetilmuramoil-L-alanina: enzima D-glutamato ligase, a afinidade do ácido fórmico (-30.3322) foi maior ao comparar com o controle Ciprofloxacina (12.0001), visto que a energia de ligação do ácido fórmico foi menor para ocorrer a interação. A melhor interação com a proteína GyrB foi avaliada para o composto majoritário Beta-carofileno, presente no OE de Cravo-da-índia, que apresentou energia de ligação de -94.4544, semelhante ao ligante controle, que obteve energia de -98.6632.

A partir dos resultados encontrados é possível predizer que a associação entre OE de Cravo-da-índia e ácido fórmico pode aumentar a chance de ligação em diferentes estruturas essenciais para os microrganismos, aumentando o espectro de ação das moléculas e tornando-as mais efetivas.

**Tabela 13.** Valores da energia de interação entre compostos majoritários de óleos essenciais, ácidos orgânicos e antibiótico (controle) frente às proteínas estudadas.

| <b>Composto</b>           | <b>Proteína</b>  | <b>Energia de ligação</b> |
|---------------------------|--|---------------------------|
| Ácido propiônico          |  | 1.19395                   |
| Ácido láctico             |  | -2.56762                  |
| Ácido fórmico             |  | -30.3322                  |
| Bornnan-2-ona (Alecrim)   | UDP-Nacetilmuramoil-L-alanina: enzima D-glutamato ligase (PDB: 1E0D) | 9.25939                   |
| Beta-pineno (Alecrim)     |  | 11.8426                   |
| Alfa-pipneno (Alecrim)    |  | 13.9106                   |
| Eucaliptol (Alecrim)      |  | 14.2059                   |
| Fenol (Orégano)           |  | 7.581                     |
| Eugenol (Cravo)           |  | 0.963485                  |
| Beta-carofileno (Cravo)   |  | -10.1697                  |
| Ciprofloxacina (Controle) |  | 12.0001                   |
| Ácido propiônico          |  | -38.1419                  |
| Ácido láctico             |  | -45.0533                  |
| Ácido fórmico             |  | -32.6453                  |
| Bornnan-2-ona (Alecrim)   | GyrB (PDB: 4PRV)   | -54.8163                  |
| Beta-pineno (Alecrim)     |  | -51.4128                  |
| Alfa-pipneno (Alecrim)    |  | -48.5824                  |
| Eucaliptol (Alecrim)      |  | -49.2769                  |
| Fenol (Orégano)           |  | -49.9926                  |
| Eugenol (Cravo)           |  | -82.4586                  |
| Beta-carofileno (Cravo)   |  | -94.4544                  |
| Ciprofloxacina (Controle) |  | -98.6632                  |

### 5.7 Determinação da atividade antioxidante

Os resultados da atividade antioxidante dos compostos testados pelo método DPPH estão apresentados na Tabela 12.

De acordo com os critérios de interpretação estabelecidos pelos autores Scherer e Godoy (2009), verificou-se que o óleo essencial de Cravo-da-Índia apresentou atividade antioxidante muito forte (IC50 3,03 ug/mL), semelhante ao composto sintético BHA (IC50 3,31 ug/mL). O composto sintético BHT apresentou IC50 de 28,74 ug/mL, classificado com atividade forte. As demais moléculas obtiveram atividade antioxidante considerada fraca, necessitando de altas concentrações para inibir 50% do radical livre (IC50).

Contudo, ao associar o composto óleo essencial de Cravo-da-Índia ao ácido fórmico a atividade antioxidante foi fraca (IC50 4227,6 ug/mL), demonstrando que a atividade isolada do Cravo-da-Índia não se mantém quando associado ao ácido.

**Tabela 12.** Classificação do poder antioxidante de óleos essenciais, ácidos orgânicos e compostos sintéticos pelo método de captura do radical livre DPPH.

| <b>Composto</b>                              | <b>Média IC 50</b> | <b>Atividade Antioxidante (AAI)</b> |
|--|--------------------|-------------------------------------|
| Óleo essencial de cravo-da-índia             | 3,03 ug/mL         | 8,08 - Muito forte                  |
| Óleo essencial de orégano                    | 10373 ug/mL        | 0,0023 - Fraco                      |
| Óleo essencial de alecrim                    | 12367 ug/mL        | 0,0018 - Fraco                      |
| Ácido láctico                                | 39211 ug/mL        | 0,0006 - Fraco                      |
| Ácido fórmico                                | 1729 ug/mL         | 0,01- Fraco                         |
| Ácido propiônico                             | 1500 ug/mL         | 0,015 - Fraco                       |
| Associação Ácido Fórmico+ OE Cravo da- índia | 4227,6 ug/mL       | 0,006 - Fraco                       |
| BHT  | 28,74 ug/mL        | 1,56 - Forte                        |
| BHA  | 3,31 ug/mL         | 6,79 - Muito forte                  |

## 6. DISCUSSÃO

A cada ano o setor da avicultura vem apresentando crescimento e necessitando de recursos para que o Brasil continue ocupando o ranking entre os países que mais produzem e comercializam no mercado de proteína animal. Para isso, deve-se acompanhar as mudanças de mercado, bem como, as legislações que são atualizadas a fim de garantir alimento seguro aos consumidores. Portanto, esse trabalho visou buscar opções de aditivos a serem empregadas na alimentação animal com finalidade de controle microbiológico e antioxidante. Os resultados obtidos demonstraram que existem opções que são efetivas e de uso permitido pelo MAPA (BRASIL, 2020).

Para determinar as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais e ácidos orgânicos, os mesmos foram testados individualmente frente a 30 isolados de diferentes gêneros que são recorrentes em surtos na cadeia avícola (GONÇALVES-TENÓRIO et al., 2018; PARRA et al., 2018; YANG et al., 2020). Verificou-se que os três ácidos orgânicos obtiveram efeito antimicrobiano, resultados semelhantes aos de Kovanda et al. (2019), que ao avaliar 8 ácidos orgânicos frente a bactérias gram-positivas e gram-negativas ATCC, os ácidos mais promissores foram sais de ácidos graxos de cadeia curta e ácido fórmico. Zobot (2016) também avaliou ácidos orgânicos frente a isolados de *Salmonella* spp. provenientes de carcaça de frangos, sendo o ácido láctico e o ácido peracético os mais efetivos, com 97,89% e 100% de taxa de inibição respectivamente.

No presente estudo, o ácido fórmico obteve a maior média de halos de inibição, resultado semelhante a de Gómez-García et al. (2019), que na avaliação do poder antimicrobiano de seis ácidos orgânicos os melhores resultados obtidos frente a isolados de *E. coli* e *Salmonella* spp. foram de ácido fórmico. A maior eficácia do ácido fórmico comparada a outros ácidos orgânicos pode ser atribuída a seu tamanho molecular e comprimento de cadeia ser menor, facilitando sua difusão pela membrana do microrganismo (NIKAIDO, 2003).

Apenas 2 óleos essenciais testados obtiveram efeito antimicrobiano, OE de cravo-da-índia e alecrim, sendo o cravo-da-índia com maior média de diâmetros de halos inibição e efetivo frente a 28 dos 30 isolados testados. Estes resultados são corroborados por Fu et al. (2007), que ao testarem o poder

antimicrobiano de OE de cravo-da-índia e alecrim pela técnica de disco difusão, verificaram que os halos de inibição formados pelo cravo foram maiores quando comparados ao alecrim. Entretanto, Saricaoglu e Turhan (2019) avaliaram os óleos essenciais de Tomilho (*Thymus vulgaris*), Alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*) frente a patógenos isolados de alimentos (*Bacillus subtilis* (NRRL-B209), *E. coli* O157:H7, (ATCC 25922), *L. monocytogenes* (ATCC 7644) e *S. aureus* (ATCC 33862), observaram que a atividade antimicrobiana do Tomilho foi significativamente maior quando comparada aos outros dois óleos.

Em contra partida, OE de orégano obteve efeito bactericida para apenas 2 isolados, demonstrando a importância de se verificar as propriedades antimicrobianas de cada amostra de óleo antes de serem empregadas em formulações, visto que diversos autores verificaram resultados opostos ao deste trabalho, em que OE orégano possuiu efeito bactericida (REIS et al., 2020; SILVA et al., 2020; BRITO et al. 2020). Essa divergência pode ser explicada devido aos fatores abióticos, que podem influenciar na composição química do óleo, como condição climática, temperatura, luminosidade e horário de coleta da planta (BORBA et al., 2016). Além disto, o OE de orégano pode ser extraído de diferentes espécies de planta, como *Origanum vulgare*, *Origanum onites*, *Coridothymus capitatus* L e *Lippia graveolens*, sendo que cada espécie pode apresentar um perfil diferente de compostos fenólicos (RAVID et al., 1986).

A partir dos resultados obtidos na avaliação das propriedades antimicrobianas, a CIM e CBM dos compostos foram determinadas apenas para as moléculas de ácido fórmico, ácido propiônico, ácido láctico, OE de cravo-da-índia e OE de alecrim, frente aos doze isolados selecionados que apresentaram maior relevância para cadeia avícola.

Dentre os ácidos orgânicos, o ácido fórmico obteve a menor CIM com 1,58 mg/mL ou 1580 mg/L, resultados semelhantes ao encontrado por Gómez-García et al. (2019). Os autores avaliaram o ácido fórmico frente a isolados de campo de *E. coli* e *Salmonella* spp., e verificaram que a CIM variou de 600 a 2400 mg/L. Os mesmos autores também verificaram que, a concentração de ácido fórmico para efeito bactericida de 99,9% dos isolados aumentou, necessitando-se de 2400 mg/L para todas as espécies, em concordância com este trabalho, em que a CBM de ácido fórmico foi de 2,38 mg/mL ou 2380 mg/L.

Contudo, no estudo de Baaboua e colaboradores (2018), o ácido láctico com CIM e CBM de 1560 mg/L demonstrou-se o mais efetivo ácido orgânico avaliado frente à *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028). O resultado distinto em relação ao presente trabalho pode ser atribuído à variação da concentração do inóculo, já que Baaboua e colaboradores avaliaram o ácido frente a  $10^3$  UFC/mL da bactéria. Tomalok (2021) também determinou a CIM de ácidos orgânicos frente a cepas de *E. coli* (ATCC 25922), *S. enterica* sorovar *Choleraesuis* (ATCC 10708) e *L. monocytogenes* (ATCC 7644) e verificou que os ácidos acético e láctico apresentaram as menores concentrações necessárias para inibição, variando de 940 a 1250 mg/L. Os ácidos orgânicos possuem concentrações inibitórias mínimas que diferem entre gêneros e sorovares, como entre *S. Heidelberg* e *S. Typhimurium*, reforçando a necessidade de definir as concentrações de uso baseando-se em testes com a maior número de microrganismos possíveis (SIMÕES, 2015; ZABOT, 2016).

Dentre os óleos essenciais, cravo-da-índia obteve as menores CIM (7,99 mg/mL ou 7990 mg/L) e CBM (12,32 mg/mL ou 12320 mg/L), sendo o mais promissor para utilização em associações quando comparado ao OE de alecrim, que necessitou de 70,06 mg/ml ou 70060 mg/L. Estes resultados são semelhantes aos observados por Fu et al. (2007), que também verificaram que o cravo apresentou a melhor atividade antimicrobiana, com CIM e CBM de até 5000 mg/L, enquanto alecrim para mesmo efeito necessitou de 20000 mg/L. Os resultados concordantes entre os estudos podem ser atribuídos ao fato dos ativos majoritários dos óleos serem semelhantes. Da mesma forma, Abdullah et al. (2015) avaliaram OE de cravo-da-índia e alecrim frente a bactérias multirresistentes, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Enterococcus faecalis*, e a atividade antibacteriana de cravo foi maior (3120 mg/L) do que alecrim (50000 mg/L). Selim (2010) estudou as propriedades antimicrobianas de onze óleos essenciais frente a isolados de *Enterococcus* resistentes a Vancomicina e *E. coli* O157:H7, dos quais eucalipto, zimbro, alecrim, sálvia, cravo e tomilho foram os mais promissores, com CBM de até 20000 mg/L.

A partir dos resultados encontrados, a associação entre óleo essencial de cravo-da-índia e ácido fórmico foi proposta através da metodologia de *Chekerboard*, com objetivo de verificar quais concentrações de cada composto

potencializariam a resposta antimicrobiana. O teste foi realizado frente a quatro microrganismos de relevância para avicultura, inclusive com notificação obrigatória ao Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA) do MAPA. O PNSA tem objetivo de prevenir e controlar as enfermidades de interesse em avicultura e saúde pública, definir ações que possibilitem a certificação sanitária da cadeia avícola e favorecer a elaboração de produtos avícolas saudáveis para o mercado interno e externo (BRASIL, 2021).

No presente estudo foi encontrado efeito sinérgico frente a *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *S. Enteritidis* (ATCC 13076) e *E.coli* APEC, com redução significativa da concentração dos compostos para efeito bactericida. Resultados concordantes com El Atki et al. (2019) que observaram efeito sinérgico ao associarem óleo essencial de canela a Cloranfenicol ( $\Sigma$ FIC 0,50) frente a isolados de *E.coli* (ATCC 25922). Giovagnoni et al. (2019), ao testarem associações de ácidos orgânicos e óleos essenciais com antibióticos frente a isolados clínicos obtidos de frangos de *Clostridium perfringens* e *Enterococcus cecorum*, observaram atividade antimicrobiana da Bacitracina a 0,5 mg/L aumentar em 88 a 100% com baixas doses de eugenol (1,40–2,80 mM). O mesmo antibiótico a 0,5 mg/L em combinação com ácido dodecanóico 0,03 e 0,06 mM inibiu o crescimento bacteriano em 80% e 96%, respectivamente. A associação entre ácidos orgânicos e óleos essenciais possibilita maiores opções de sítios de ação na bactéria. Já demonstrado por Grilli e Piva (2012), que ácidos orgânicos facilitam a entrada de óleos essenciais nas células bacterianas pela formação de poros na membrana celular, resultando no efeito antibacteriano sinérgico. Por vezes, o uso de moléculas isoladamente não produz efeitos inibitórios eficazes e a associação com outros produtos aumenta seu desempenho individual, seu espectro de ação, redução de toxicidade e redução de bactérias resistentes (RIBEIRO et al., 2016).

Frente ao isolado de campo *Salmonella Gallinarum*, a associação entre os compostos foi aditiva ( $\Sigma$ FIC 0,515). Fu et al. (2007) ao associarem OE de cravo-da-índia ao alecrim avaliaram efeitos aditivos frente *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Escherichia coli* (ATCC 8739), *Proteus vulgaris* (ATCC 49132) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). O efeito aditivo é caracterizado pela soma dos efeitos das substâncias individuais, não observando uma interação

significativa entre os antimicrobianos. Entretanto, com a associação observou-se a diminuição das concentrações de ácido fórmico e OE de cravo-da-índia, mantendo sua atividade antimicrobiana e tornando a formulação economicamente mais viável (FREIRE, 2018).

Quanto à cinética de morte, dois microrganismos foram escolhidos para avaliação, *Escherichia coli* APEC e *Salmonella* Gallinarum, devido serem isolados provenientes de surtos na cadeia avícola. Determinar o tempo mínimo de contato entre os compostos e microrganismos para efeito bactericida é de fundamental importância, visto que isso determinará sua aplicação no campo. A associação entre ácido fórmico (0,03 mg/mL) e cravo-da-índia (1,63 mg/mL) possuiu efeito bactericida com 60 minutos de contato para ambos os microrganismos, resultado semelhante aos encontrado por Fu et al. (2007), que ao associarem dois óleos essenciais, cravo e alecrim, na concentração determinada pela CBM o efeito bactericida ocorreu com 12 horas de contato e na concentração de 2x da CBM, dentro de 2 horas. Liu et al. (2018) ao avaliarem isolados de *Enterobacter cloacae* provenientes de carne de frango em contato com ácido láctico, verificaram que em 60 minutos 6 log de UFC/mL foram inativadas.

A associação sinérgica entre diferentes moléculas, além de diminuir a concentração dos compostos necessária para efeito bactericida, potencializa seu efeito com menor tempo de contato. Conforme descrito por Chaveerach et al. (2002), que verificaram efeito bactericida do ácido fórmico, acético, propiônico e clorídrico ocorreu em até 4 horas isoladamente e, em até 1 hora quando associados. Os resultados encontrados no presente estudo são satisfatórios ao comparar o tempo de trânsito ou passagem do alimento pelo TGI de aves, visto que pode durar até 221 minutos (Andreotti et al., 2004), tendo o tempo de contato mínimo necessário para realizar o controle microbiológico proposto.

De acordo com os resultados encontrados nesse estudo, o potencial antimicrobiano e antioxidante foi verificado principalmente para as moléculas de cravo-da-índia e ácido fórmico. Dessa forma através da metodologia de docking molecular, foi possível avaliar dois possíveis alvos proteicos que essas moléculas interagem e compreender como seu efeito antibacteriano ocorre. A escolha das proteínas se baseou a partir dos seguintes critérios: ser um genoma central do patógeno, comum na maioria das cepas de *Salmonella* e *E. coli*, não homólogo em aves e gene essencial para o patógeno.

A UDP-N-acetilmuramoil-L-alanina: enzima D-glutamato ligase é uma enzima citoplasmática que catalisa a adição de D-glutamato ao precursor de nucleotídeo UDP-N-acetilmuramoil-L-alanina, sendo fundamental para biossíntese intracelular de peptídeoglicanos e, conseqüentemente para síntese da parede celular bacteriana (A BERTRAND et al., 2000). No presente estudo, a molécula que obteve mais afinidade de ligação a esta enzima foi o ácido fórmico, que necessitou de uma energia de ligação menor (-30.3322). Qadir et al. (2018) ao avaliarem o potencial de inibição de derivados de ácido acético e ácido láctico frente a enzima UDP-N-acetilmuramoil-L-alanina: enzima D-glutamato ligase, verificaram que os compostos interagiram com precisão à enzima, com energia de ligação de no máximo -7.757989.

Frente à proteína GyrB, responsável pela ligação e hidrólise de ATP que fornece energia para o superenrolamento do DNA (Holdgate et al, 1997), verificou-se nesse estudo que o composto majoritário Beta-carofileno possuiu a menor energia de ligação (-94.4544). Fang et al. (2016), ao avaliarem o potencial de inibição da proteína GyrB por diversos flavonoides, observaram que mais de dois terços dos compostos testados apresentaram viabilidade em se ligar à proteína e inibi-la. Além disso, o presente estudo verificou que o composto majoritário Eugenol também apresentou baixa energia de ligação à proteína (-82.4586). Estes resultados são concordantes com Vimal et al. (2018), que ao avaliarem OE de Cravo-da-índia identificaram que as menores energias de ligação à enzima L- asparaginase encontrada na *Salmonella* sp. foram de Eugenol, com energia de -5,836.

Além do controle microbiológico que os óleos essenciais podem exercer, há diversos estudos na literatura verificando seu potencial como antioxidante (OLIVEIRA, 2018; SARICAOGLU; TURHAN, 2018; MSSILLOU et al., 2020; ABD-ELGAWAD et al., 2020). Este é um importante parâmetro a ser verificado, visto a variedade de aplicações na nutrição animal que esses compostos podem ter, como inclusão em rações com função de conservantes e propriedades antioxidantes nos perfis bioquímicos sanguíneos (ALAGAWANY et al, 2021; NING et al., 2021).

O presente estudo avaliou três óleos essenciais, cravo-da-índia, orégano e alecrim, sendo que apenas o óleo de cravo-da-índia apresentou atividade antioxidante comparável aos antioxidantes sintéticos BHT e BHA. Resultados

similares também foram encontrados por Saricaoglu e Turhan (2018), que ao avaliarem as propriedades antioxidantes de OE Cravo-da-índia, Alecrim e Tomilho pelo método DPPH, a maior capacidade encontrada foi de cravo-da-índia. A atividade antioxidante desta molécula é ligada aos compostos majoritários fenólicos, como o eugenol e seus derivados, juntamente com níveis menores de  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -humuleno (ASBAHANI et al., 2015). Esses compostos dão origem a moléculas de hidrogênio, a partir de grupos hidroxilas fenólicas presentes na estrutura moleculares dos óleos, doando átomos para radicais e prevenindo a oxidação de ácidos graxos livres (CIESLA et al., 2016). Os resultados encontrados por Alfikri et al., 2020 reforçam a importância desses ativos majoritários que, ao avaliarem amostras de OE de cravo-da-índia extraídos em diferentes estágios de árvores jovens e maduras verificaram que a fase de floração produziu a maior quantidade de óleo, sendo composto majoritário Eugenol, apresentando a melhor atividade antioxidante.

Objetivando verificar se as propriedades antioxidantes seriam influenciadas com a associação entre OE de cravo-da-índia e ácido fórmico, a análise de potencial antioxidante foi testada frente a mesma formulação empregada na curva de morte. Avaliou-se que a associação com ácido orgânico tornou a atividade antioxidante fraca. Isso pode ocorrer devido à supressão do mecanismo de doação de elétrons da molécula de cravo para o radical livre DPPH (LITWINIENKO E INGOLD, 2003). Resultados também obtidos por Quiroga et al. (2019), que ao associarem  $\alpha$ -terpineno com ácido acético, obtiveram uma baixa atividade antioxidante pelo método de DPPH. Ao contrário dos achados por Lo Scalzo (2008) e Pereira et al. (2010) que, ao verificarem o potencial antioxidante de ácido málico e cítrico associados observaram sinergia e aumento da atividade antioxidante. Os diferentes resultados encontrados na literatura reforçam a importância de verificar a manutenção das propriedades antioxidantes ao associar compostos fenólicos a ácidos orgânicos, visto a tendência de mercado em substituir antioxidantes sintéticos por naturais, pois são considerados mais seguros (Quiroga et al., 2019).

A associação proposta entre ácido fórmico e OE de cravo-da-índia apresenta afinidade a diferentes proteínas presentes nas bactérias, aumentando o espectro de ação e sua eficácia, sendo uma importante opção de substituição aos antibióticos utilizados na avicultura.

## CONCLUSÃO

O presente estudo possibilitou verificar as propriedades antimicrobianas e antioxidantes de compostos já comercializados no mercado de nutrição animal. Verificou-se que dos compostos testados, ácido láctico, ácido fórmico, ácido propiônico, OE de cravo-da-índia e OE de alecrim possuem atividade antimicrobiana frente a grande parte dos isolados testados. As menores CIM e CBM foram avaliadas para ácido fórmico (0,03 mg/mL) e OE de cravo-da-índia (1,63 mg/mL), resultados que determinaram a associação entre os compostos para avaliação do sinergismo.

A combinação entre os compostos foi sinérgica para *S. Typhimurium* (ATCC 14028), *S. enteritidis* (ATCC 13076) e *E. coli* APEC e aditiva para *S. Gallinarum*, determinando que as concentrações de ácido fórmico e OE de cravo, quando associados, podem ser diminuídas mantendo-se as propriedades antimicrobianas dos compostos. Além disso, foi possível determinar que a associação proposta entre ácido fórmico e OE de cravo-da-índia possuiu efeito bactericida em 60 minutos de contato com os microrganismos, tempo necessário para efeito no TGI de aves.

Através da metodologia *in silico* de Docking molecular, foi possível confirmar que, entre todos os compostos testados nesse trabalho, ácido fórmico e OE de cravo-da-índia obtiveram maior afinidade a estruturas proteicas essenciais a *E. coli* e *Salmonella*.

Na avaliação do poder antioxidante, o OE de cravo-da-índia obteve a menor taxa de inibição de 50% do radical livre (3,03 ug/mL), entretanto, ao associar o mesmo com ácido fórmico a taxa de inibição é elevada (4227,6 ug/mL), sendo considerada uma atividade antioxidante fraca.

Determinou-se através desse trabalho que ácido fórmico e OE de cravo-da-índia apresentam o melhor potencial antimicrobiano para aplicação na nutrição animal e o OE de cravo isoladamente é a melhor aplicação para atividade antioxidante.

## 1. REFERÊNCIAS

- Abertrand J, Fanchon E, Martin L, Chantalat L, Auger G, Blanot D, Van Heijenoort J, Dideberg O. 2000. "Open" structures of MurD: domain movements and structural similarities with folypolyglutamate synthetase. *Journal Of Molecular Biology*. 301(5):1257-1266.
- Abd-elgawad A, Gendy A, El-amier Y, Gaara A, Omer E, Al-rowaily S, Assaeed A, Al-rashed S, Elshamy A. 2020. Essential oil of *Bassia muricata*: chemical characterization, antioxidant activity, and allelopathic effect on the weed *Chenopodium murale*. *Saudi Journal Of Biological Sciences*. 27(7):1900-1906.
- Abdullah B, Hatem S, Jumaa W. 2015. A Comparative Study of the Antibacterial Activity of Clove and Rosemary Essential Oils on Multidrug Resistant Bacteria. *Uk Journal Of Pharmaceutical Biosciences*. 3(1):18.
- ABPA - ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL (Brasil). **Relatório anual 2021**. 2021. São Paulo. Disponível em: <<http://abpabr.org/relatorios/>>. Acesso em: 09 jun. 2021.
- Adams C A. **Food components in Health and Nutrition**. 1999. Nottingham Univ. Press. Nottingham. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/>. Acesso em: 09 jun. 2021.
- Alagawany M, El-saadony M T, Elnesr S, Farahat M, Attia G, Madkour M, Reda F.M. 2021. Use of lemongrass essential oil as a feed additive in quail's nutrition: its effect on growth, carcass, blood biochemistry, antioxidant and immunological indices, digestive enzymes and intestinal microbiota. *Poultry Science*.100(6):101-172.
- Alexandrino S, Christofoli M, Souza C, Costa T, Faria F, Rezende C, Santos F, Minafra C, Pereira P. 2020. Microbiota intestinal e os fatores que influenciam na avicultura. *Research, Society and Development*. 9(6):1- 24.
- Alfikri F, Pujiarti R, Wibisono M, Hardiyanto E. 2020. Yield, Quality, and Antioxidant Activity of Clove (*Syzygium aromaticum*L.) Bud Oil at the Different Phenological Stages in Young and Mature Trees. *Scientifica*. 20:1-8.
- Alma M.H, Ertas M, Nitz S, Kollmannsberger H. 2007. Chemical composition and content os essential oil from the bud of cultivated Turkish clove (*Syzygium aromaticum* L.), *BioResources*, 2: 265-269.
- Andreotti M, Junqueira O, Barbosa M, Cancherini L, Araújo L, Rodrigues E. 2004. Energia metabolizável do óleo de soja em diferentes níveis de inclusão para frangos de corte nas fases de crescimento e final. *Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia*.33(5):1145-1151.

- Araujo J. A, Silva J. H. V, Amâncio A. L.L, Lima M. R, Lima C. B. 2007. Uso de aditivos na alimentação de aves. *Acta Veterinaria Brasilica*, 1(3): 69-77.
- Araújo L, et al. 2015. Composição química e susceptibilidade do óleo essencial de óregano (*Origanum Vulgare* L., família *lamiaceae*) frente à cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella choleraesuis*. *B. Ceppa*. 33(1):73-78.
- Asbahani A. E, Miladi K, Badri W, Sala M, Addi E. H. A, Casabianca H. 2015. Essential oils: From extraction to encapsulation. *International Journal of Pharmaceutics*. 483:220–243.
- Authority E.F.S. 2016. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2015. *EFSA*. 14( 4634).
- Baaboua A, Maadoudi M, Bouyahya A, Belmehdi O, Kounoun A, Zahli R, Abrini J. 2018. Evaluation of Antimicrobial Activity of Four Organic Acids Used in Chicks Feed to Control *Salmonella typhimurium*: suggestion of amendment in the search standard. *International Journal Of Microbiology*. 2018:1-9.
- Bajalan I, Rouzbahani R, Pirbalouti A, Maggi F. 2017. Antioxidant and antibacterial activities of the essential oils obtained from seven Iranian populations of *Rosmarinus officinalis*. *Industrial Crops And Products*, 107: 305-311.
- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck, D, Idaomar, M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*. 446–475.
- Baron L.F, Pazinato R, Baron C.P. 2020. Oxidação de lipídeos e as implicações na nutrição e saúde de animais de produção. *Cadernos de Ciência & Tecnologia*. 37(1): 265-297.
- Barton M.D. 2000. Antibiotic use in animal feed and its impact on human health. *Nutrition Research Reviews*. 13: 279-299.
- Bastos-leite, S, et al. 2016. Ácidos orgânicos e óleos essenciais sobre o desempenho, biometria de órgãos digestivos e reprodutivos de frangas de reposição. *Acta Veterinaria Brasilica*. 10(3):201-207.
- Bellaver C, Scheuermann G. 2004. **Aplicações de ácidos orgânicos na produção de aves de corte**. In: Conferencia Avesui, 3. Florianópolis, SC. Anais eletrônicos. Concórdia: Embrapa CNPSA, 2004. Disponível em: < [http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc\\_publicacoes/publicacao\\_h6n45p3z.pdf](http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/publicacao_h6n45p3z.pdf) >
- Berchieri J. A, Macari M. 2009. Doenças das aves. Campinas: FACTA. 455-469.
- Bergamo G, Demoliner F, Timm C, Carvalho N, Helbig E, Gandra E. 2015. Avaliação da Capacidade de Formação de Biofilmes e da Resistência a

- Antimicrobianos de Salmonella spp. isolados em Produtos Cárneos provenientes da Região Sul do Brasil. *Ciência Animal Brasileira*. 21: 1-10.
- Bezerra W. G. A, Horn R.H, Silva I.N.G, Teixeira R.S.C, ; Lopes E.S, Albuquerque Á.H, Cardoso W.C. 2017. Antibiotics in the poultry industry: a review on antimicrobial resistance. *Archivos de zootecnia*. 66(254):301-307
- Bochio, V. 2019. **Óleo essencial e ácidos orgânicos na alimentação de frango de corte: desempenho e qualidade intestinal**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Zootecnia, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Dois Vizinhos.
- Borba, Eliakin Sato de, Vale G, Burkhardt I, Hartin L, Quandt M. 2016. **Extração e determinação da composição química dos óleos essenciais de espécies de plantas medicinais**. TCC (Graduação) - Curso de Curso Técnico em Química Integrado, Instituto Federal Catarinense, Araquari.
- Boroski M, Visentainer J, Cottica S, Morais D. 2015. Antioxidantes princípios e métodos analíticos. *Curitiba*. 64–71.
- Bozin B, Mimica D.N, Simin N, Anackov G. 2006. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae species and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J Agric Food Chem*. 54(5):1822-8.
- Brasil. **Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil - informe 2018**. 2019. Disponível em: [http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/08/25/Informe\\_Surtos\\_De\\_Doenças\\_Transmitidas\\_por\\_Alimentos\\_no\\_Brasil\\_2018.pdf](http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/08/25/Informe_Surtos_De_Doenças_Transmitidas_por_Alimentos_no_Brasil_2018.pdf). Acesso em: 25 ago. 2019.
- Brasil. Instituto brasileiro de geografia e estatística. **Pesquisa Trimestral do Abate de Animais**. 2020. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/estatisticas/economicas/agricultura-e-pecuaria/21119-primeiros-resultados-2abate.html?edicao=27679&t=o-que-e>. Acesso em: 21 maio 2020.
- Brasil. Instrução Normativa nº 26, de 10 de julho de 2009. **Instrução Normativa 26/2009**.
- Brasil. Instrução Normativa nº 44, de 15 de dezembro de 2015. *Diário Oficial da União*.
- Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA)**. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/saude-animal-e-vegetal/saude-animal/programas-de-saude-animal/pnsa/programa-nacional-de-sanidade-avicola-pnsa>. Acesso em: 28 jun. 2021
- Brasil. Ministério da Saúde. 2011. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial da Salmonella spp**. 1.ed. Brasília.

Brasil. Portaria nº 171, de 13 de dezembro de 2018. **Informa sobre a intensão de proibição de uso de antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho de alimentos e abre prazo manifestação.** Diário oficial da união.

Brasil. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Aditivos aprovados pelo mapa para uso na alimentação animal.** 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/alimentacao-animal/arquivos-alimentacao-animal/Listaaditivos17.03.2020.pdf>. Acesso em: 10 jun. 2021.

Brasil. Secretaria de Defesa Agropecuária. **Ministério da agricultura, pecuária e abastecimento.** 2020. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-pecuarios/arquivos-de-insumos-pecuarios/Substanciasproibidas20.02.2020.pdf>. Acesso em: 09 jun. 2021.

Brenner F.W, Villar R.G, Angulo F.J, Tauxe R, Swaminathan B. 2002. Salmonella nomenclature. J. Clin. Microbiol. 38:2465-2467.

Brito D. A. P, Sousa Lima L, Soares, B. S, Pinheiro S. C. S. 2020. Atividade antimicrobiana de óleo essencial de orégano frente a sorovares de salmonella enterica com resistência a antibióticos. Brazilian Journal of Development. 6(12):94029-94036.

BUCHANAN, Robert L.; GORRIS, Leon G.M.; HAYMAN, Melinda M.; JACKSON, Timothy C.; WHITING, Richard C.. A review of Listeria monocytogenes: an update on outbreaks, virulence, dose-response, ecology, and risk assessments. Food Control, [S.L.], v. 75, p. 1-13, maio 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.12.016>.

Calaça G, Café M, Andrade M, Stringhiniltallo J, Araújo C, Leandro N. 2019. Frangos desafiados experimentalmente com Salmonella enterica sorovar enteritidis e eimeria tenellae tratados com ácidos orgânicos. Cienc. Anim. Bras, Goiânia. 20:1-10.

Cangen J. R. 2011. Food poisoning and diarrhea: Small intestine effects. Curr Gastroenterol. 11:442-448.

Castanon J.I.R. 2007. History of the use of antibiotics as growth promoters in European poultry feeds. Poultry Science. 86(11):2466-2471.

Castro A. G. M de. 2005. Patologias gastrointestinais: importância do controle. Fórum internacional de avicultura. Foz do Iguaçu. Anais. Animal World.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. The Foodborne Outbreak Online Database (FOOD Tool). Current search data, 2016.

- Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf, J. 2014. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J Antimicrob Chemother*, 69: 827-834.
- Charteris W.P, Kelly P.M, Morelli L, Collins K. 1997. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial population. *Int. J. Food Microbiol*, 35:1-27.
- Chaveerach P, Keuzenkamp D, Urlings H, Lipman L, Knapen F. 2002. In Vitro Study on the Effect of Organic Acids on *Campylobacter jejuni/coli* Populations in Mixtures of Water and Feed. *Poultry Science*. 81(1):621-628.
- Chilante R, Kussakawa K, Flemming J. 2012. Efeitos da utilização de óleos essenciais na alimentação de aves matrizes pesadas. *Revista Acadêmica Ciência Animal*. 10(4): 387-394.
- Ciesla L. M, Wojtunik-kulesza K. A, Oniszczyk A, Waksmundzkahajnos M. 2016. Antioxidant synergism and antagonism between selected monoterpenes using the 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Flavour and Fragrance Journal*. 31(6):412-419.
- Clinical & Laboratory Standards Institute- CLSI. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard — Sixth Edition. NCCLS document M7-A6, Wayne, Pa, USA; 2003
- Cody, R. An introduction to SAS university edition. SAS Institute, 2015.
- Colombe S, Jernberg C, Lof E, Angervall AL, Mellstrom-Dahlgren H, Dotevall L. 2019. Outbreak of unusual H<sub>2</sub>S-negative monophasic *Salmonella* Typhimurium strain likely associated with small tomatoes. *Euro Surveill*. 24(47):1–7.
- Cosby D. E, Cox N. A, Harrison M. A, Wilson J. L, Buhr R. J, Fedorkacray P. J. 2015. *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: A review. *The Journal Applied Poultry Research*. 24:408–426.
- Cossart P, Lebreton A. 2014. A trip in the 'New Microbiology' with the bacterial pathogen *Listeria monocytogenes*. *Federation of European Biochemical Societies*. 588: 2437-2445.
- Crispim G.J.B, Foggiatto J. 2013. Análise do potencial de ação bacteriolítico de *Rosmarinus officinalis* frente a cepas Gram positivas e Gram negativas. *Ensaio e ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde*. 7(5): 33-50.
- Cruz C.D, Martinez M.B, Destro M.T. 2008. *Listeria monocytogenes*: um agente infeccioso ainda pouco conhecido no Brasil. *Alim. Nutr*. 19(2):195-206.

- D'Antuono L.F, Galletti G.C, Bocchini P. 2010. **Variability of essential oil content and composition of *Origanum vulgare* L. populations from a North Mediterranean area (Liguria Region, Northern Italy)**. Dissertação mestrado. Universidade de São Paulo
- Devi K.P, Nisha S.A, Sakthivel S, Pandian S.K. 2010. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. *Journal of Ethnopharmacology*. 130:107-115.
- Dias G, De Carvalho B.O, Medeiros P.T.M, Sousa F.D. R, Gomes A.V.C, De Souza M.M.S, De Lima C.A.R. 2015. Óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.) na dieta de frangos de corte como equilibrador da microbiota intestinal. *Revista Brasileira de Medicina Veterinária*. 37(1):108-114.
- Dias M. R, Cavicchioli V. Q, Camargo A. C, Lanna F. G. P. A, Pinto P. S. A, Bersot L. S, Nero L. A. 2016. Molecular tracking of *Salmonella* spp. in chicken meat chain: from slaughterhouse reception to end cuts. *International Journal of Food Science and technology*. 53:1084-1091.
- Dibner J.J, Buttin P. 2002. Use of organic acids as a model to study the impact of gut microflora on nutrition and metabolism. *Journal of Applied Poultry Research*. 11:453-463.
- Dorman H.J.D, Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology, West Sussex*. 88(2):308-316.
- Duarte, Felipe Diniz. 2007. **Efeitos de fontes lipídicas em dietas para frangos de corte sobre o desempenho, rendimento e composição da carcaça**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-graduação em Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- El Atki, Y, Aouam I, El Kamari F, Taroq A, Nayme K, Timinouni M, Lyoussi B, Abdellaoui A. 2019. Antibacterial activity of cinnamon essential oils and their synergistic potential with antibiotics. *J. Adv. Pharm. Technol. Res*. 10: 2–63.
- European Food Safety Auth. 2015. European Centre for Disease. Control The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013. *EFSA Journal*.13(1) : 3991.
- Fang Y, Lu Y, Zang X, Wu T, Qi X, Pan S, Xu X. 2016. 3D-QSAR and docking studies of flavonoids as potent *Escherichia coli* inhibitors. *Scientific Reports*. 6(1):1-13.
- Fascina V. B. 2011. **Aditivos fitogênicos e ácidos orgânicos em dietas de frangos de corte**. Tese (Doutorado em Zootecnia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu.

- Fascina V. D, Pasquali G. A. M, Carvalho F. B, Muro E. M, Vercese F, Aoyagi M. M. 2017. Effects of Phytogenic Additives and Organic Acids, alone or in combination, on the Performance, Intestinal Quality and Immune Responses of Broiler Chickens. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*.19(3):497-508.
- Fernandes R. V. D. B, Marques G. R, Borges S. V, Botrel D. A. 2014. Effect of solids content and oil load on the microencapsulation process of rosemary essential oil. *Industrial Crops and Products*. 58:173–181.
- Ferreira A. J. P, Knöbl T. 2009. Enfermidades bacterianas. *Doenças das aves*. *Facta*.4:457-474.
- França M.I. 2008. **Uso de formiato de sódio e potássio em rações para frangos**. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) – Universidade Federal do Paraná – Curitiba, PR.
- Freire N. 2018. **Atividade antimicrobiana do extrato de *hymenaea martiana hayne (fabaceae)* e compostos antimicrobianos frente a isolados clínicos de *Staphylococcus aureus***. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós graduação em Recursos Naturais do Semiárido, Programa de Pósgraduação em Recursos Naturais do Semiárido, Petrolina.
- Freitas L.A.R, Bertoglio O.A. 2001. Evolução da avicultura de corte brasileira após 1980. *Revista Economia e Desenvolvimento*. 13:100-135.
- Freschi J. 2014. **Ácidos orgânicos isolados ou associados em dietas de frangos de corte**. Dissertação (Mestrado) - Curso de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia Animal, Universidade Estadual Paulista JÚlio de Mesquita Filho, Dracena.
- Fu Y, Zu Y, Chen L, Shi X, Wang Z, Sun S, Efferth T. 2007. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. *Phytotherapy Research*. 21(10):989-994.
- Funari Junior P, Ishizuka A, Silva R, Rodrigues A, Mariussi A, Pereira V, Silva I, Silva V. 2001. Efeitos da utilização de ácidos orgânicos em rações de frangos de corte. *PUBVET*. 5(25):1157-1164.
- Gabaron D. A, Otutumi L. K, Piau Júnior R. 2015. Surtos de salmonelose notificados no período de janeiro de 2009 a julho de 2014 no estado do Paraná, Brasil. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR*.18: 33- 37.
- García M.A, Sanz J. 2001. Analysis of *Origanum vulgare* volatiles by direct thermal desorption coupled to gas chromatography-mass spectrometry. *J. Chromatogr*. 918(1):189-194.
- Gauthier R. 2005. Modo de ação dos acidificantes e interesse que geram na fase de crescimento e terminação. *Revista Pork World*. Paulínia. 28:52-58.

- Gerber Marcelo Silva. **Saúde intestinal das aves**. 2015. Disponível em: <<https://www.ourofinoeanimal.com/ourofinoemcampo/categoria/artigos/saude-intestinal-das-aves/>>. Acesso em: 31 out. 2019.
- Giovagnoni G, Tugnoli B, Piva A, Grilli E. 2019. Organic Acids and Nature Identical Compounds Can Increase the Activity of Conventional Antibiotics Against *Clostridium Perfringens* and *Enterococcus Cecorum* In Vitro. *Journal Of Applied Poultry Research*. 28(4):1398-1407.
- Gómez-garcía Manuel, Sol C, Nova P. J. G. de; Puyalto M, Mesas L, Puente H, Mencía-ares Ó, Miranda R, Argüello H, Rubio P. 2019. Antimicrobial activity of a selection of organic acids, their salts and essential oils against swine enteropathogenic bacteria. *Porcine Health Management*. 5(1):1-8.
- Gonçalves, V. 2017. **Atividade antimicrobiana e antiaderente in vitro do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* contra *Enterococcus faecalis***. Trabalho de conclusão de curso- Universidade Estadual da Paraíba, Centro de ciência e tecnologia.
- Gonçalves-tenório A, Silva B, Rodrigues V, Cadavez V, Gonzales-barron U. 2018. Prevalence of Pathogens in Poultry Meat: a meta-analysis of european published surveys. *Foods*. 7(5): 69.
- Gonzales E, Mello H, Café M. 2012. Uso de antibióticos promotores de crescimento na alimentação e produção animal. *Revista Ufg*.13(13):1-6.
- Glisson J.R. 2008. Pasteurellosis and others respiratory bacterial infection. *Diseases of Poultry*. 12:739-758.
- Granados-chinchilla F; Rodríguez C. 2017. Tetracyclines in Food and Feedingstuffs: from regulation to analytical methods, bacterial resistance, and environmental and health implications. *Journal Of Analytical Methods In Chemistry*. 1-24.
- Grilli E, Piva A. 2012. Organic acids and their role in reducing foodborne pathogens in food animals. T.R. Callaway, T.S. Edrington (Eds.), *On-Farm Strategies to Control Foodborne Pathogens*. NOVA Science Publishers.183-210
- Guenette S. A, Rodd A, Marier J. F, Beaudry F, Vachon P. 2007. Pharmacokinetics of eugenol and its effects on thermal hypersensitivity in rats. *European Journal of Pharmacolog*. 562:60– 67.
- Hamidi A, Irsigler H, Jaeger D, Muschaller A, Fries R. 2014. Quantification of water as a potential risk factor for cross-contamination with *Salmonella*, *Campylobacter* and *Listeria* in a poultry abattoir. *British poultry science*. 55(5):585-591.

- Hashemi S. R, Davoodi H. 2011. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary Research Communications, Oxford*. 35(2):169–180.
- Hofer E, Da silva filho S. J, Moura E, Dos reis F. 1998. Sorovares de Salmonella isolados de matérias-primas e de ração para aves no Brasil *Pesquisa Veterinaria Brasileira*. 18(1):21–27.
- Holdgate G. A, Tunnicliffe A, Ward W, Weston S, Rosenbrock G, Barth P, Taylor I, Richard A. 1997. The entropic penalty of ordered water accounts for weaker binding of The antibiotic novobiocin to a resistant mutant of DNA gyrase: a thermodynamic and crystallographic study. *Biochemistry*. 36:9663–9673.
- IBGE - Instituto brasileiro de geografia e estatística (Brasil) (org.). **Trimestrais da pecuária - primeiros resultados: cai o abate de bovinos e cresce o de suínos e de frangos no 1º trimestre de 2021**. 2021. Disponível em: <https://agenciadenoticias.ibge.gov.br/agencia-sala-de-imprensa/2013-agencia-de-noticias/releases/30720-trimestrais-da-pecuaria-primeiros-resultados-cai-o-abate-de-bovinos-e-cresce-o-de-suinos-e-de-frangos-no-1-trimestre-de-2021>. Acesso em: 09 jun. 2021.
- JAY James. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.
- Junqueira O. M, Duarte K. F. 2005. Resultados de Pesquisa com aditivos alimentares no Brasil. In: 42ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Zootecnia, Goiânia. Anais. 169- 182.
- Kadariya J, Smith T.C, Thapaliya D. 2014. Staphylococcus aureus and Staphylococcal Food-Borne Disease: an ongoing challenge in public health. *Biomed Research International*. 2014:1-9.
- Karaman İ, Şahin F, Güllüce M, Öğütçü H, Şengül M, Adigüzel A. 2003. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of Juniperus oxycedrus L. *J Ethnopharmacol*. 85: 231-235.
- Khan M, Khan S. T, Khan N. A, Mahmood A, Al-Kedhairi A. A, Alkathlan H. Z. 2018. The composition of the essential oil and aqueous distillate of *Origanum vulgare* L. growing in Saudi Arabia and evaluation of their antibacterial activity. *Arabian Journal of Chemistry*. 11(8):1189-1200.
- Kokkini S, Vokou D, Karousou R. 1991. Morphological and chemical variation of *Origanum vulgare* L. in Greece. *Bot. Chronica*. 10: 337-346.
- Kondo S, Tsuda K, Muto N, Ueda J. 2002. Antioxidant activity of apple skin or flesh extracts associated with fruit development no selected apple cultivars. *Sci Hortic*. 96(1-4):177-185.

- Kovanda L, Zhang W, Wei X, Luo J, Wu X, Atwill E, Vaessen S, Li X, Liu Y. 2019. In Vitro Antimicrobial Activities of Organic Acids and Their Derivatives on Several Species of Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Molecules*. 24(20):3770.
- Krishan G, Narang A. 2014. Use of essential oils in poultry nutrition: A new approach. *Journal Of Advanced Veterinary And Animal Research*. 1(4):156-16.
- Langhout, P. 2005. Alternativas ao uso de quimioterápicos na dieta de aves: A visão da indústria e recente avanços. Palestra outorgada a Conferência Apinco 2005 de Ciências e Tecnologias. *Anais*. 21-33.
- Lee CC, Lee NY, Yan JJ, Lee HC, Chen PL, Chang CM, Wu CJ, Ko NY, Wang LR, Chi CH, Ko WC. 2010. Bacteremia due to Extended-Spectrum- $\beta$ -Lactamase-producing *Enterobacter cloacae*: Role of Carbapenem Therapy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 54 (9):3551-3556.
- Lee Y. S, Jang K. A, Cha J. D. 2012. Synergistic Antibacterial Effect between Silibinin and Antibiotics in Oral Bacteria. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. 1– 7.
- Leem H, Kim E, Seo M, Choi S. 2011. Antioxidant and anti-inflammatory activities of eugenol and its derivatives from clove (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Journal of the Korean Society of Food Science and Nutrition*. 40(10):1361-1370.
- Levinson W, Jawetz E. **Microbiologia médica e imunologia**. 7 ed. Porto Alegre. Artmed. 2005. p. 133 – 136.
- Litwinienko G, Ingold K. U. 2003. Abnormal solvent effects on hydrogen atom abstractions. 1. The reactions of phenols with 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH•) in alcohols. *Journal of Organic Chemistry*, 68(9), 3433–3438.
- Liu S, Ji X, Sang P, Liang J, Ai S, Xia Y, Li Y, Du X. 2016. Insights into Protein-Ligand Interactions: Mechanisms, models and Methods. *Int. J. Mol. Sci*. 17(2):144.
- Lorenzo V. **Estudos *in silico* com alcaloides oriundos de produtos naturais. João Pessoa**, 2016. Tese apresentada ao programa de Pós graduação de Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciência e Saúde da Universidade Federal da Paraíba. Área de concentração: Farmacoquímica.
- Londres. 2014. Review on antimicrobial resistance. *Antimicrobial Resistance: Tackling a Crisis for the Future Health and Wealth of Nations*. Disponível em: <https://amr-review.org/>. Acesso em: 12 ago. 2021.
- Loscalzo R. 2008. Organic acids influence on DPPH scavenging by ascorbic acid. *Food Chemistry*. 107(1):40-43.

- Lynne A. M, Kariyawasam S, Wannemuehle Y, Johnson T. J, Johnson S. J, Sinha A. S, Lynne D. K, Moon H. W, Jordan D. M, Logue G. M, Foley S. L, Nolan L. K. 2012. Recombinant Iss as a Potential Vaccine for Avian Colibacillosis. *Avian Diseases*, Kennet Square, 56(1):192-199.
- Ma Y, Islam G, Wu Y, Sabour P, Chambers J, Wang Q, Wu S, Griffiths M. 2016. Temporal distribution of encapsulated bacteriophages during passage through the chick gastrointestinal tract. *Poultry Science*. 95(12) 2911-2920.
- Macari M. 2014. Produção de frangos de corte. *FACTA*, p,565.
- Machado G. S, Fontes D. O, Corrêa G. S. S, Silva M. A, Corrêa A. B. 2007. Ácidos orgânicos na alimentação de suínos. *Cadernos Técnicos de Veterinária e Zootecnia*, 53.
- May A, Suguino E, Martins N, Barata L.E.S, Pinheiro M.Q. 2010. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, Botucatu*. 12(2):195-200.
- May J, Chan C.H, French C.G. 2000. Time Kill studies of tea tree oils on clinical isolates. *J. Antimicrob. Chemother*. 45(5):639-643.
- Mellor S. 2000. Alternatives to antibiotic. *Pig Progress*. 16(1):18-21.
- Menezes-blackburn D, Gabler S, Greiner R. 2015. Performance of Seven Commercial Phytases in an in Vitro Simulation of Poultry Digestive Tract. *Journal Of Agricultural And Food Chemistry*. 63(27):6142-6149.
- Meng X.Y, Zhang H.X, Mezei M, Cui M. 2011. Molecular Docking: A Powerful Approach for Structure-Based Drug Discovery. *Current Computer-Aided Drug Design*. 7:146- 157.
- Mohamed WAM, Abd-Elhakim YM, Farouk SM. 2016. Protective effects of ethanolic extract of rosemary against lead-induced hepato-renal damage in rabbits. *Exp Toxicol Pathol*. 68(8): 451-461.
- Motta A. S, Flores, F. S, Souto A. A, Brandelli A. 2007. Antibacterial activity of a bacteriocin-like substance produced by *Bacillus* sp. P34 that targets the bacterial cell envelope. *Antonie van Leeuwenhoek*. 93( 3):275-284.
- Mountzouris K.C, Paraskevas V, Tsirtsikos P, Palamidi I, Schatzmayr G, Fegeros K. 2011. Assessment of a phytogenic feed additive effect on broiler growth performance, nutrient digestibility and caecal microflora composition. *Anim. Feed Sci. Tech*. 168:223-231.
- Mssillou, I Agour A, Ghouizi A, El; hamamouch, N, Lyoussi B, Derwich E. 2020. Chemical Composition, Antioxidant Activity, and Antifungal Effects of

- Essential Oil from *Laurus nobilis* L. Flowers Growing in Morocco. *Journal Of Food Quality*. 2020:1-8.
- Mulder R, Schlundt J. 1999. Safety of poultry meat: from farm to table. In: International Consultative Group on Food Irradiation (ICGFI), FAO/IAEA/WHO.
- Munita J.M, Arias C.A. 2016. Mechanisms of Antibiotic Resistance. *Microbiol Spectr.Texas*. 4(2):1-37.
- Nascimento V.P, Gama N.M.S.Q, Canal C.W. 2009. Coriza infecciosa das galinhas, pasteurelose e outras infecções bacterianas relacionadas. *Facta*. 2:503-530.
- Newell D. G, Koopmans M, Verhoef L, Duizer E, Aidara-Kane A., Sprong H. 2010. Food-borne diseases - The challenges of 20 years ago still persist while new ones continue to emerge. *Int. J. Food Microbiol*. 139: 3–15.
- Nikaido H. 2003. Molecular basis of bacterial outer membrane permeability revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*.67:593–656.
- Ning L, Zhang X, Zhang D, Hu Y, Li Y. 2021. The benefits of blend essential oil for GIFT tilapia on the digestion, antioxidant, and muscle quality during cold storage. *Aquaculture*. 533:736097
- Oliveira S. 2018. **Antioxidant activities of the essential oils of *Croton grewoides* Baill. and *Croton tetradenius* Baill., together with their genotypes and major compounds**. São Cristóvão: UFS. Dissertação-Mestre em Agricultura e Biodiversidade.
- Parra A, Toro M, Jacob R, Navarrete P, Troncoso M, Figueroa G, Reyes-jara A. 2018. Antimicrobial effect of copper surfaces on bacteria isolated from poultry meat. *Brazilian Journal Of Microbiology*. 49:113-118.
- Pereira D. M, Faria J, Gaspar L, Ferreres F, Valentão P, Sottomayor M, Andrade P. B. 2010. Exploiting *Catharanthus roseus* roots: Source of antioxidants. *Food Chemistry*. 121(1):56 – 61.
- Peres L.E.P. 2007. Metabolismo secundário. Disponível em: <http://www.ciagri.usp.br/~lazaropp/FisioVegGradBio/MetSec.pdf>.
- Pickler L, Hayashi R, Lourenço M, Miglino L, Caron L, Beirão , Silva A, Santin E. 2012. Avaliação microbiológica, histológica e imunológica de frangos de 10 corte desafiados com *Salmonella enteritidis* e Minnesota e tratados com ácidos 11 orgânicos. *Revista Veterinária Brasileira*. 32(1):.27-36.

- Pombo J, Ribeiro E, Pinto R, Silva B. 2018. Efeito antimicrobiano e sinérgico de óleos essenciais sobre bactérias contaminantes de alimentos. *Segurança Alimentar e Nutricional*. 25(2): 108-117.
- Qadir M, Mushtaq H, Mobeen T. 2018. In-silico study of potential carboxylic acid derivatives as D-glutamate ligase inhibitors in *Salmonella typhi*. *Kuwait J. Sci.* 1(45):100-107.
- Queiroz J. P. A. F, Melo A, Dias F. K. D. 2015. Aditivos fitogênicos na alimentação de frangos de corte: óleos essenciais e especiarias. *PubVet*. 9(12):526-535.
- Quinn P. J, Markey B. K, Carter M. E, Donnelly W.J, Leonard W.J. 2005. Agentes antimicrobianos. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas*. 6:42-49.
- Quiroga P.R, Nepote V, Baumgartner M. T. 2019. Contribution of organic acids to  $\alpha$ -terpinene antioxidant activity. *Food Chemistry*. 277:267-272.
- Radünz M, Trindade M, Camargo T, Radünz A, Borges C, Gandra E, Helbig E. 2019. Antimicrobial and antioxidant activity of unencapsulated and encapsulated clove (*Syzygium aromaticum*, L.) essential oil. *Food Chemistry*. 276:180-186.
- Rao J, Chen B, McClements D. J. 2019. Improving the Efficacy of Essential Oils as Antimicrobials in Foods: Mechanisms of Action. *Annual Review of Food Science and Technology*, 10(1).
- Ravid U, Putievsky E. 1986. In progress in essential oil research – Carvacrol and Thymol Chemotypes of East Mediterranean Wild Labiatae Herbs. Ernst-Joachim Brunke Eds. Walter de Gruyter-Berlin. 163.
- Reis J. B, de Figueiredo L. A, Castorani G. M, Veiga S. M. O. M. 2020. Avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais contra patógenos alimentares. *Brazilian Journal of Health Review*. 3(1):342-363.
- Reis R.S. **Abordagem proteômica da interação bactéria-hospedeiro na colibacilose aviária**. 2011. Dissertação de mestrado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Ribeiro S. M, Felício M, Boas E, Gonçalves S, Costa F, Samy R, Santos N, Franco O. 2016. New frontiers for anti-biofilm drug development. *Pharmacology & Therapeutics*. 160:133–144.
- Roberts B, Chakravarty D, Gardner J.C, Ricke S, Donaldson J. 2020. *Listeria monocytogenes* Response to Anaerobic Environments. *Pathogens*. 9(3):210-219.
- Rouger A, Tresse O, Zagorec M. 2017. Bacterial Contaminants of Poultry Meat: sources, species, and dynamics. *Microorganisms*. 5(3):50.

- Sakomura N, Silva J, Costa F, Fernandes J. 2014. **Nutrição de não ruminantes**. Jaboticabal: Funep. 678 p.
- Santos Jr A.A, Ferket P.R. 2007. Fatores dietéticos que afetam a saúde intestinal e a colonização por patógenos. Conferência apinco 2007 de Ciências e Tecnologia Avícola. Anais. p.143-160. Santos.
- Santos J, Carvalho F, Barros T.F, Guimaraes A.G. 2011. Atividade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de orégano, alho, cravo e limão sobre bactérias patogênicas isoladas de vôngole. Semina: Ciências Agrárias. 32(4):1537-1564.
- Santurio M.J, Santurio D.F, Pozzati P, Moraes C, Franchin P.R, Alves S.H. 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de Salmonella de origem avícola. Ciência Rural, Santa Maria. 37(3):803-808.
- Sakomura N.K., Silva J.H.V. da, Costa F.G.P, Fernandes J.B.K, Hauschild L. 2014. Nutrição de não ruminantes. Jaboticabal: Funep.
- Sarcinelli M, Venturini K. S, Silva L. C. 2007. Produção de frango de corte. Boletim técnico. Espírito Santo: Pró-Reitoria de Extensão da Universidade Federal do Espírito Santo.
- Saricaoglu F.T, Turhan S. 2018. Antimicrobial Activity and Antioxidant Capacity of Thyme, Rosemary and Clove Essential Oils and Their Mixtures. J Inno Sci Eng, Turkey. 1(2):25-33.
- Savioli J.Y. 2010. Pesquisa e caracterização de Escherichia coli patogênica (E. coli produtora de toxina Shiga – STEC; E. coli aviária patogênica - APEC) de fragatas (Fregata magnificens) da Costa do Estado de São Paulo. Dissertação mestrado. Universidade de São Paulo
- Scherer R, Godoy H.T. 2009. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Food Chemistry. 112(3):654-658.
- Selim S. 2010. Antimicrobial activity of essential oils against vancomycin-resistant enterococci (vre) and escherichia coli O157:H7 in feta soft cheese and minced beef meat. Brazilian Journal Of Microbiology. 5(42):187-196.
- Silva J. P. L, Duarte-Almeida J. M, Perez D. V, Franco B. D. G. D. M. 2020. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a Salmonella Enteritidis. Food Science and Technology. 30:136-141.
- Silva V.B. 2008. **Estudos de modelagem molecular e relação estrutura atividade da oncoproteína hnRNPK e ligantes**. Ribeirão Preto. Dissertação de mestrado apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Física Biológica.

- Silveira SM, Cunha Jr. A, Scheuermann GN, Secchi FL, Verruck S, Krohn M. 2012. Composição química e atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cymbopogon winterianus* (citronela), *Eucalyptus paniculata* (eucalipto) e *Lavandula angustifolia* (lavanda). *Rev Inst AdolfoLutz*. São Paulo. 71(3):471-80.
- Simões R.S. 2015. **Uso de probióticos e ácidos orgânicos em frangos de corte desafiados com *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg**. Dissertação (Pós-graduação em Ciência Animal), Universidade Federal do Paraná, Patolína, PR.
- Snogerup S. 1971. Evolutionary and plant geographical aspects of Chasmophytic communities. In P. H. Davis, P. C. Harper, & I. C. Hedge (Eds.), *Plant life of South–West Edinburgh: The Botanical Society*. 157–170.
- Solomons T. W, Frylhe C. B. 2005. **Química orgânica**. v.1 e v.2. 8.ed. LTC - 15 Livros Técnicos e Científicos.
- Soucy S. M, Huang J, Gogarten J. P. 2015. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nat. Rev. Genet.* 16:472–482.
- Sousa C. M. M, Chaves M.H. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química Nova*. 30(2):351-355.
- Souza E.L. 2006. **Potencial antimicrobiano do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.): Uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos**. Tese (Doutorado – Nutrição) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.
- Souza L.M.G, Murakami A.E, Marcato S.M, Massuda E.M, Sozmen F, Uysal B, Kose E.O, Aktas O, Cinbilgel I, Oksal B.S. 2012. Extraction of the essential oil from endemic *Origanum bilgeri* with two different methods: comparison of the oil composition and antibacterial activity. *Chem. Biodivers.* 9:1356–1363
- Swamy MK, Akhtar MS, Sinniah UR. 2016. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. *Evid. Based Complement. Altern. Med.*
- Talamini D.J.D, Martins F.M, Santos Filho, J.I. 2018. Conjuntura Econômica da Avicultura brasileira em 2018. *Avicultura Industrial*. (11): 20-25.
- Teixeira E, Silva J.H.V, Costa F.P.G, Goulart C.C, Melo T.S. 2013. Óleo essencial de erva-doce na ração de frangos de corte alojados em cama nova e reciclada. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*. 65(3): 874-884.
- Tomalok C. **AVALIAÇÃO DE ÁCIDOS ORGÂNICOS PARA CONTROLE MICROBIOLÓGICO EM GORDURA DE PAPADA SUÍNA**. 2021. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós-Graduação em

Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões Uri Erechim, Erechim.

Tondo E.C. 2019. **Microbiologia e sistemas de gestão da segurança de alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Sulina. p.399.

Tong S.Y.C, Davis J.S, Eichenberger E, Holland T.L, Fowler V.G. 2015. Staphylococcus aureus infections: Epidemiology, pathophysiology, clinical manifestations, and management. Clin. Microbiol. 28:603–661.

Touchon M, Perrin A, Sousa J.A.M, Vangchhia B, Burn S, O'brien C.L, Denamur E, Gordon D, Rocha E. 2020. Phylogenetic background and habitat drive the genetic diversification of Escherichia coli. Plos Genetics. 16(6):1-1.

Trabulsi L.R, Alterthum F. 2008. **MICROBIOLOGIA**. 5. ed. São Paulo: Atheneu.

Traeseli C, Lopes S.T.A, Wolkmer P, Schmidt C, Santurio J.M, Alves S.H. 2011. Óleos essenciais como substituintes de antibióticos promotores de crescimento em frangos de corte: perfil de soroproteínas e peroxidação lipídica. Ciência Rural. 41(2): 278-284.

Trombetta D. 2005. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Washington, DC. 49(6):2474-2478.

União europeia. **Regulamento nº 1831/2003, de 22 de julho de 2003. Relativo Aos Aditivos Destinados à Alimentação Animal**. Jornal Oficial da União Europeia.

Utimi N.B.P. 2016. **Nutrição de precisão para frangos de corte**. Tese (Doutorado) - Curso de Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paul, Pirassununga.

Valandro C. **Biosseguridade na avicultura**. Avicultura industrial, 1 dez. 2009. Disponível em:

<<https://www.aviculturaindustrial.com.br/imprensa/biosseguridade-na-avicultura/20091201-115709-b874>> . Acesso em: 9 jul. 2020.

Valgimigli L. 2012. Essential oils: an overview on origins, chemistry, properties and uses. In: Essential oils as natural food additives. Valgimigli, L. Nova Science Publishers. 1-24.

Verdonk M.L, Cole J.C, Hartshorn M. J, Murray C. W, Taylor R.D. 2003. Improved protein-ligand docking using Gold. Proteins-Structure Function and Genetics. 52:609-623.

Vieco-saiz N, Belguesmia Y, Raspoet R, Auclair E, Gancel F, Kempf I, Drider D. 2019. Benefits and Inputs From Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins as Alternatives to Antibiotic Growth Promoters During Food-Animal Production. Frontiers In Microbiology. 10:1-7.

- Vimal A, Jha A, Kumar A. 2018. Eugenol derivatives prospectively inhibit l-asparaginase: a heady target protein of salmonella typhimurium. *Microbial Pathogenesis*. 114: 8-16.
- Vignaroli C, Zandri G, Aquilanti L, Pasquaroli S, Biavasco F. 2011. Multidrug-resistant Enterococci in meat and faeces and co-transfer of resistance from an Enterococcus durans to a human Enterococcus faecium. *Curr. Microbiol.* 62:1438-1447.
- Wang W, Nan L, Meng L, Yuangang Z, Efferth T. 2012. Antibacterial activity and anticancer activity of Rosmarinus officinalis L. essential oil compared to that of its main components. *Molecules*. 17:2704-2713.
- Yang X, Huang J, Zhang Y, Liu S, Chen L, Xiao C, Zeng H, Wei X, Gu Q, Li Y. 2020. Prevalence, abundance, serovars and antimicrobial resistance of Salmonella isolated from retail raw poultry meat in China. *Science Of The Total Environment*. 713:136385.
- Yin-Hing Ma G. S, Ying W, Parviz M, Sabour J.R. Chambers Q.W, Shirley X. Y. W, Mansel W.G. 2016. Temporal distribution of encapsulated bacteriophages during passage through the chick gastrointestinal tract, *Poultry Science*. 95(12): 2911–2920.
- Zabot S. **Atividade antimicrobiana de ácidos orgânicos e compostos clorados sobre micro-organismos patogênicos em carne de frango.** 2016. Dissertação (Mestrado) - Curso de Programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Londrina..
- Zanelato E.A. **Utilização de ácidos orgânicos como substitutos a antibióticos promotores de crescimento para frangos de corte.** 2009. Dissertação (Mestrado) - Curso de Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Paraná, Curitiba.
- Zen S, Iguma M.D, Ortelan C.B, Santos V.H.S, Felli C.B. 2014. Evolução da avicultura no brasil. *Centro de Estudos Avançados em Economia Aplicada*. 1(1):1-4.
- Zhai H, Liu H, Wang S, Wu J, Kluentner A. 2018. Potential of essential oils for poultry and pigs. *Animal Nutrition*. 4(2): 179-186.
- Zou L.K, Wang H.N, Zeng B, Li J.N, Li X.T, Zhang A.Y, Zhou Y.S, Yang X, Xu C.W, Xia Q.Q. 2011. Erythromycin resistance and virulence genes in Enterococcus faecalis from swine in China. *New Microbiol*. 34:73-80.
- Zuanaze, M. A. F. Doenças das aves. Campinas: Facta, 2009. cap.4.