

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E MEDICINA VETERINÁRIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

**GEOVANE ROSA DE OLIVEIRA**

**ANTIMICROBIANOS NATURAIS PARA CONTROLE DE *SALMONELLA*  
ENTERITIDIS NA RAÇÃO E NO TRATO DIGESTÓRIO SIMULADO DE  
FRANGOS DE CORTE**

*Natural antimicrobial in control of Salmonella Enteritidis in feed and trough simulated  
digestion of broilers*

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS**

**2016**

**GEOVANE ROSA DE OLIVEIRA**

**ANTIMICROBIANOS NATURAIS PARA CONTROLE DE *SALMONELLA*  
ENTERITIDIS NA RAÇÃO E NO TRATO DIGESTÓRIO SIMULADO DE  
FRANGOS DE CORTE**

*Natural antimicrobial in control of Salmonella Enteritidis in feed and trough simulated  
digestion of broilers*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, área de concentração Saúde, Tecnologia e Produção Animal, da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Leandro Batista Costa  
Co-orientadora: Profa. Dra. Renata Ernlund  
F. de Macedo

**SÃO JOSÉ DOS PINHAIS**

**2016**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Câmpus São José dos Pinhais

O48a  
2016

Oliveira, Geovane Rosa de  
Antimicrobianos naturais para controle de Salmonella enteritidis na ração e no trato digestório simulado de frangos de corte = Natural antimicrobial in control of Salmonella enteritidis in feed and trough simulated digestion of broilers / Geovane Rosa de Oliveira ; orientador, Leandro Batista Costa ; co-orientadora, Renata Ernlund Freitas de Macedo. – 2016.  
xiv, 78 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná, São José dos Pinhais, 2016  
Bibliografia: p. 58-78  
Texto português e inglês

1. Agentes antiinfeciosos. 2. Essências e óleos essenciais. 3. Ácidos orgânicos. 4. Frango de corte. 5. Digestão. I. Costa, Leandro Batista. II. Macedo, Renata Ernlund Freitas de. III. Pontifícia Universidade Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. IV. Título. V. Título: Natural antimicrobial in control of Salmonella enteritidis in feed and trough simulated digestion of broilers.

CDD 20. ed. – 636.089



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal  
Câmpus São José dos Pinhais

**PUCPR**  
GRUPO MARISTA

**ATA Nº 0092 E PARECER FINAL DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE Mestrado  
EM CIÊNCIA ANIMAL DO ALUNO GEOVANE ROSA DE OLIVEIRA**

Aos vinte e seis dias do mês de fevereiro do ano de dois mil e dezesseis, às 14:00 horas, realizou-se no anfiteatro do Mestrado em Ciência Animal da Escola de Ciências Agrárias e Medicina Veterinária da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, localizada na Rodovia 376 – Km 14 – São José dos Pinhais - PR, a sessão pública de defesa da Dissertação do mestrando Geovane Rosa de Oliveira, intitulada: **“ANTIMICROBIANOS NATURAIS PARA CONTROLE DE SALMONELLA ENTERITIDIS EM RAÇÃO E NO TRATO DIGESTÓRIO SIMULADO DE FRANGOS DE CORTE”**. O mestrando concluiu os créditos exigidos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal, segundo os registros constantes na secretaria do Programa. Os trabalhos foram conduzidos pelo Professor orientador e Presidente da banca, Dr. Leandro Batista Costa (PUCPR), auxiliada pelos Professores Doutores Fernando Bittencourt Luciano (PUCPR) e Everton Luis Krabbe (EMBRAPA – Aves e Suínos). Procedeu-se à exposição da Dissertação, seguida de sua arguição pública e defesa. Encerrada a fase, os examinadores expediram o parecer final sobre a Dissertação, que nos termos do Artigo 53 do Regulamento deste Programa de Pós-Graduação, foi considerada Aprovada.

**Prof. Dr. Leandro Batista Costa (Presidente)**

Assinatura [Assinatura]

**Prof. Dr. Fernando Bittencourt Luciano (PUCPR)**

Assinatura [Assinatura]

**Prof. Dr. Everton Luis Krabbe (EMBRAPA – Aves e Suínos)**

Assinatura [Assinatura]

Proclamado o resultado, a Presidente da Banca Examinadora encerrou os trabalhos, e para que tudo conste, eu Regiani de Fátima Terto, confiro e assino a presente ata juntamente com os membros da Banca Examinadora.

São José dos Pinhais, 26 de fevereiro de 2016.

[Assinatura]

**Profa. Dra. Renata Ernlund Freitas de Macedo**

**Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

[Assinatura]

**Regiani de Fátima Terto**

**Secretária do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal**

## SUMÁRIO

	Página
AGRADECIMENTOS.....	viii
FORMATO DA DISSERTAÇÃO.....	ix
RESUMO GERAL.....	x
ABSTRACT.....	xi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xiv
LISTA DE FIGURAS.....	xv
CAPÍTULO 1	
1 INTRODUÇÃO.....	1
CAPÍTULO 2	
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	6
2.1 <i>Salmonella</i> Enteritidis: Características morfofisiológicas.....	6
2.2 Panorama e ocorrência de <i>Salmonella</i> Enteritidis na avicultura.....	7
2.3 <i>Lactobacillus</i> sp: Características morfofisiológicas.....	9
2.4 Anatomia e fisiologia do sistema digestório de frangos.....	10
2.5 Utilização de agentes antimicrobianos naturais.....	15
2.5.1 Características e mecanismo de ação dos ácidos orgânicos.....	15
2.5.2 Formação e ocorrência de isotiocianato de alila na mostarda.....	19
2.5.3 Isotiocianato de alila: Mecanismo de ação.....	21
2.5.4 Formação e ocorrência de carvacrol no orégano.....	23
2.5.5 Carvacrol: Mecanismo de ação.....	24
2.5.6 Antimicrobianos naturais na dieta de frangos.....	26
2.6 Utilização de modelos laboratoriais para simulação de digestão.....	27
CAPÍTULO 3	
3 ANTIMICROBIANOS NATURAIS PARA CONTROLE DE <i>SALMONELLA</i> ENTERITIDIS NA RAÇÃO E NO TRATO DIGESTÓRIO SIMULADO DE FRANGOS DE CORTE.....	30
Resumo.....	30
Abstract.....	31
3.1 INTRODUÇÃO.....	32
3.2 MATERIAL E MÉTODOS.....	34
3.2.1 Experimento 1: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	34
3.2.1.1 Preparação do inóculo.....	34
3.2.1.2 Preparação dos antimicrobianos de origem natural.....	34
3.2.2 Experimento 2: Determinação do efeito combinado de óleos essenciais e ácidos orgânicos.....	35
3.2.3 Experimento 3: Efeito dos antimicrobianos naturais adicionados à ração sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	36

3.2.3.1 Preparo das amostras.....	36
3.2.3.2 Seleção de cepas de <i>Salmonella</i> Enteritidis resistentes para inoculação na ração.....	37
3.2.3.3 Preparo do inóculo.....	38
3.2.3.4 Inoculação da <i>Salmonella</i> Enteritidis na ração.....	39
3.2.3.5 Tratamento da ração com antimicrobianos de origem natural.....	39
3.2.3.6 Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis na ração.....	40
3.2.4 Determinação de pH na ração contendo antimicrobianos.....	40
3.2.5 Experimento 4: Simulação da digestão <i>in vitro</i> de frangos de corte.....	40
3.2.5.1 Preparo do inóculo.....	40
3.2.5.2 Preparo dos antimicrobianos naturais.....	41
3.2.5.3 Simulação da digestão <i>in vitro</i> de frangos de corte.....	41
3.2.5.4 Simulação da digestão no papo.....	41
3.2.5.5 Simulação da digestão no proventrículo.....	41
3.2.5.6 Simulação da digestão na moela.....	42
3.2.5.7 Simulação da digestão no intestino delgado.....	42
3.2.5.8 Simulação da digestão no intestino grosso.....	42
3.2.5.9 Avaliação do efeito dos antimicrobianos naturais após digestão <i>in vitro</i> sobre <i>Salmonella</i> Enteritidis e sobre <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	42
3.2.7 Análise Estatística.....	45
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	46
3.3.1 Experimento 1: Concentração inibitória mínima (CIM).....	46
3.3.2 Experimento 2: Efeito combinado de óleos essenciais e ácidos orgânicos sobre a <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	47
3.3.3 Experimento 3: Atividade antibacteriana da combinação de ITA e CAP adicionados à ração.....	48
3.3.4 Experimento 4: Efeito dos antimicrobianos naturais contra <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Lactobacillus plantarum</i> após digestão <i>in vitro</i> .....	50
3.4 CONCLUSÃO.....	56
CAPÍTULO 4	
4 CONCLUSÃO GERAL.....	57

## *Dedico*

*À minha mãe, ao meu pai e minhas irmãs e a todos os familiares,  
pela paciência e amor incondicional, pelo apoio sem limites  
e por não medirem esforços para me verem feliz;*

*Ao meu amigo Rodinei José Garcia,  
pelo incentivo, força, conselhos e exemplo de positivismo  
e honestidade que me permitiram chegar até aqui.*

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus e a Santa Rita, por interceder por mim, me dar força e coragem para trilhar o meu caminho nessa jornada, mantendo minha fé, esperança, saúde e proteção.

À minha família, em especial minha mãe Iracema, meu pai Osvaldo e irmãs Luciana e Ivaneide, por sempre estarem ao meu lado em todos os momentos.

À Pontifícia Universidade Católica do Paraná, por disponibilizar os laboratórios para realização deste projeto, por todo acolhimento e oportunidade de desempenhar o mestrado.

Ao Professor Dr. Leandro Batista Costa, pela orientação, apoio e oportunidade, essenciais para realização deste trabalho.

À Professora e Coorientadora Renata Ernlund Freitas de Macedo, pela colaboração na realização deste trabalho.

À Professora Carla de Andrade, por todo apoio, colaboração e amizade.

Ao Professor Fernando Bittencourt Luciano, pela parceria, profissionalismo e orientação.

Ao meu grande amigo Rodinei José Garcia, por todo apoio, por compartilhar experiências e por acreditar em nossa amizade, todo meu respeito, admiração e gratidão.

Ao amigo e companheiro de pesquisa Willian K. Oliveira, por toda ajuda durante a realização desse projeto.

Ao meu amigo Maycon Amaral, pelo apoio e companhia durante o mestrado.

Ao amigo Diego Brandão pela colaboração e apoio, e aos demais alunos e amigos, Laisa, Monique, Hanna.

Aos demais professores e funcionários do curso de Medicina Veterinária e Pós-Graduação em Ciência Animal da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, pela participação, dedicação na condução deste trabalho.

À *Impextraco Latino America*® pela parceria, colaboração e realização deste trabalho.

## **FORMATO DA DISSERTAÇÃO**

A presente dissertação é composta por 5 capítulos.

O capítulo 1 apresenta uma introdução geral dos objetivos de estudo desta dissertação.

O capítulo 2 trata-se de revisão de literatura.

O capítulo 3 apresenta o artigo científico referente ao experimento realizado nos laboratórios de pesquisas da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, o qual será submetido para futura publicação.

O Capítulo 4 apresenta as conclusões gerais do trabalho, apontando ainda sugestões para estudos futuros.

As referências do material bibliográfico utilizado em todos os capítulos se encontram em lista única ao final da dissertação.

## RESUMO GERAL

*Salmonella* Enteritidis é um dos patógenos veiculados pela carne de frango, que pode ser transmitido às aves pelo consumo de ração contaminada. Com a proibição da adição de antibióticos profiláticos à ração animal pelos países europeus, o uso de aditivos naturais tem ganhado destaque. Para verificar o efeito antimicrobiano dos aditivos naturais no trato digestório de frangos de corte, a digestão simulada pode ser um método eficiente e confiável. Para isso, o presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito antimicrobiano *in vitro* de óleos essenciais (OE) e ácidos orgânicos (AO), isolados ou em combinação, sobre a população de *Salmonella* Enteritidis na ração e no trato digestório simulado de frangos de corte. Para os OE, foram testadas doses de 12,5 a 800 ppm de isotiocianato de alila (ITA) e doses de 50 a 800 ppm de carvacrol (CV). Para os AO, foram utilizadas doses de 37 a 297 ppm de ácido propiônico (PROP) e doses de 23 a 930 ppm de ácido caproico (CAP). As diferentes doses dos antimicrobianos foram adicionadas em caldo TSB, em pH 6,0, e avaliadas frente a um *pool* de 5 cepas de *Salmonella* Enteritidis, incubado a 37°C/24h. A partir dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos compostos isolados, foram testadas combinações de OE + AO com doses reduzidas em 1/2, 1/4 e 1/8 da CIM para avaliar o efeito combinado dos aditivos. Os antimicrobianos selecionados foram adicionados em uma ração comercial para frangos de corte na fase inicial para avaliar seus efeitos sobre o crescimento de *Salmonella* Enteritidis. Para esta etapa, as concentrações de antimicrobianos utilizadas foram: T1 – controle (inoculado apenas com *Salmonella* Enteritidis); T2 - 62,5 ppm de ITA + 175 ppm de CAP; T3 - 125 ppm de ITA + 350 ppm de CAP; T4 - 187,5 ppm de ITA + 525 ppm de CAP. As contagens de *Salmonella* foram realizadas a cada dois dias, durante 8 dias. Em seguida, o tratamento com melhor efeito contra *Salmonella* foi selecionado para a simulação da digestão (*in vitro*) de frangos, frente ao *pool* de *Salmonella* Enteritidis e *Lactobacillus plantarum*. Para isso, foi utilizada ração comercial de frangos de corte, na fase inicial, sem adição de antibióticos e com a inclusão de ITA e CAP nas concentrações de 187,5 ppm e 525 ppm. A ração com os antimicrobianos foi submetida ao processo de digestão *in vitro* pelo tempo total de 4h20min. Foram avaliados os compartimentos que simulavam as condições enzimáticas, de pH, temperatura e agitação do papo, proventrículo, moela, intestino delgado e intestino grosso. Entre os OEs, a menor CIM foi obtida para o ITA (25 ppm) enquanto que a CIM do CV foi de 150 ppm; e entre os AOs, o CAP apresentou efeito inibitório em menor dose (70 ppm), enquanto a CIM do PROP foi de 75 ppm. Nos testes de sinergia, a menor combinação que apresentou efeito sinérgico foi verificado com a concentração de 6,25 ppm de ITA e 17,5 ppm de CAP. Na ração, o T4 reduziu a presença de *Salmonella* Enteritidis de  $2.63 \pm 0,21$  log para níveis indetectáveis (<1,25 log) após 8 dias (P<0,05). No processo de digestão *in vitro*, foi observada diferenças (P<0,05) nas contagens de *Salmonella* Enteritidis. No entanto, a população de *Lactobacillus plantarum* não sofreu alteração. A combinação de 187,5 ppm de ITA e 525 ppm de CAP foi eficiente contra *Salmonella* Enteritidis em ração e após o processo de digestão *in vitro*, não afetando a contagem de *Lactobacillus plantarum* no intestino delgado.

**Palavras-chave:** Ácidos orgânicos, óleos essenciais, frangos, digestão simulada, efeito sinérgico.

## ABSTRACT

*Salmonella* Enteritidis is one of the pathogens spread by poultry, which can be transmitted to birds by the consumption of contaminated feed. By the banning of the addition of prophylactic antibiotics to animal feed by European countries, the use of natural antimicrobial compounds has gained prominence. To check the antimicrobials effect of natural additives in the digestive tract of broilers, the simulated digestion is an efficient method and reliable. This *in vitro* study was carried out to evaluate the antimicrobial effect of essential oils (EO) and organic acids (OA), alone or combined, against *Salmonella* Enteritidis and *Lactobacillus plantarum*. The tested doses of allyl isothiocyanate (AITC) were 12.5 to 800 ppm, while 50 to 800 ppm were tested to carvacrol (CV). Further, propionic and caproic acids (CAP) were tested using doses of 37 to 297 ppm and 23 to 930 ppm, respectively. The different doses of these antimicrobial agents were added in TSB broth, pH 6.0, and evaluated against five strains of *Salmonella* Enteritidis, incubated at 37°C/24h, to find the minimal inhibitory concentration (MIC). After finding the MICs from these isolated compounds, the association of EO + OA in concentrations of 1/2, 1/4, and 1/8 from the MIC was tested to investigate if there is a synergic antimicrobial effect. The tested antimicrobials were included in a commercial feed for broiler chickens to assess its effects on growth of *Salmonella* Enteritidis. For this step, the antimicrobial concentrations used were T1 - control (only inoculated with *S. Enteritidis*); T2 - 62.5 ppm of AITC + 175 ppm of CAP; T3 - 125 ppm of AITC + 350 ppm of CAP; T4 - 187.5 ppm of AITC + 525 ppm of CAP. Afterwards, *Salmonella* counts were performed on 0, 2, 4, 6, and 8 days to assess the antibacterial effect of the AITC + CAP. Then treatment with a better antibacterial effect against *Salmonella* was selected to simulate the *in vitro* digestion of chickens, against the pool of *Salmonella* Enteritidis and *Lactobacillus plantarum*. For this, a commercial feed was used for broiler chickens in the initial stage of life, without antibiotics, with inclusion of AITC and CAP at concentrations of 525 ppm and 187.5 ppm, respectively, and a control treatment without antimicrobials. The feed with antimicrobials was submitted to *in vitro* digestion by 4h20min. The *in vitro* digestive process was mimicked in the crop, proventriculus, gizzard, small intestine and large intestine compartments of broilers, in enzymatic conditions, pH, temperature and agitation specific for this species. Among the EO, the lowest MIC was obtained for AITC (25 ppm), the MIC CV was 150 ppm; and among the OA, the CAP showed inhibitory effect in the smaller dose (70 ppm), the MIC PROP was 75 ppm. The association of 6.25 ppm of AITC and 17.5 mM of CAP was the lowest dose capable of presenting synergistic effect. In the feed, the T4 reduced from  $2.63 \pm 0,21$  log to undetectable levels ( $<1.25$  log) the presence *Salmonella* Enteritidis on 0 to 8 days. After the *in vitro* digestion, T4 also decreased ( $P<0.05$ ) accounts of *Salmonella* Enteritidis. The *Lactobacillus plantarum* cultures collected from the digesta were not altered. The combination of 187.5 ppm of AITC and 525 ppm CAP was effective against *Salmonella* Enteritidis strains in the feed, and afterwards, *in vitro* digestion, however, did not affect the *Lactobacillus plantarum* colonies in the mimicked small intestine.

**Keywords:** Natural antimicrobial, broilers, simulated digestion, synergistic effect and digestive system.

## LISTA DE ABREVIATURAS

CAP	Ácido Caproico
CDC	Centers for Disease Control and Prevention
CV	Carvacrol
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Doenças transmitidas por alimentos
EFSA	European Food Safety Authority
FICI	Índice de concentração inibitória fracionada
ITA	Isotiocianato de alila
LPS	Lipopolissacarídeo
OEs	Óleos essenciais
PCA	Agar padrão para contagem
PROP	Ácido Propiônico
SVS	Secretaria de vigilância em saúde
TSB	Caldo triptona de soja
XLD	Desoxicolato lisina xilose

## LISTA DE TABELAS

		<b>Página</b>
Tabela 1	Concentrações dos óleos essenciais carvacrol (CV) e isotiocianato de alila (ITA) e dos ácidos orgânicos caproico (CAP) e propiônico (PROP) testados em diferentes combinações	35
Tabela 2	Composição percentual e valores nutricionais calculados da ração para frangos de corte na fase inicial.....	37
Tabela 3	Tratamentos de ITA e CAP adicionados à ração de frangos para controle de <i>Salmonella</i> Enteritidis.....	39
Tabela 4	Concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos naturais em combinação contra <i>Salmonella</i> Enteritidis <i>in vitro</i> e índice de concentração inibitória fraciona (IFIC).....	47
Tabela 5	Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis (log UFC/g) em ração de frango tratada com diferentes concentrações da combinação de isotiocianato de alila (ITA) e ácido caproico (CAP) durante 8 dias	48
Tabela 6	Efeito da adição de isotiocianato de alila e ácido caproico no pH da ração de frangos de corte.....	49

## LISTA DE FIGURAS

	<b>Página</b>
Figura 1	Sistema Digestório da ave: esôfago, papo, proventrículo, moela, intestino delgado (duodeno, jejuno e íleo) intestino grosso (ceco, reto), cloaca, fígado e pâncreas..... 11
Figura 2	Estrutura geral das túnicas que constituem a parede do intestino das aves..... 14
Figura 3	A) Estrutura dos glucosinolatos, cadeia lateral “R” derivada a partir de aminoácidos. B) Catalisação das moléculas de agliconas pela enzima mirosinase, enquanto os produtos finais são formados não enzimaticamente ou através de uma proteína. 19
Figura 4	Procedimento de exposição de <i>Salmonella</i> Enteritidis ao aumento sequencial da concentração de NaCl no meio..... 38
Figura 5	Procedimento de digestão simulada da ração de frango adicionada de antimicrobianos naturais para avaliação da sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis..... 43
Figura 6	Procedimento de digestão simulada da ração de frango adicionada de antimicrobianos naturais para avaliação da sobrevivência de <i>Salmonella</i> Enteritidis..... 44
Figura 7	Procedimento de digestão simulada da ração de frango adicionada de antimicrobianos naturais para avaliação da sobrevivência de <i>Lactobacillus plantarum</i> ..... 45
Figura 8	Contagem de <i>S. Enteritidis</i> (log UFC/mL) em ração de frango adicionada da combinação de ITA + CAP após a digestão simulada in vitro..... 51
Figura 9	Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis e <i>Lactobacillus plantarum</i> (log UFC/mL) no intestino delgado, após a digestão simulada de frango de corte..... 54

## CAPÍTULO 1

### 1 INTRODUÇÃO

A *Salmonella* Enteritidis, está entre os principais micro-organismos causadores de doenças entéricas transmitidas por alimentos em humanos no mundo, além de provocar perdas significativas na produtividade animal, com elevado índice de mortalidade (Mead et al., 2010; Olaimat e Holley, 2013). Anualmente, são documentados pela *European Food Safety Authority* (EFSA, 2015), aproximadamente 100.000 casos de doenças entéricas, sendo a salmonelose a segunda doença mais relatada. De acordo com os dados do *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC), cerca de um milhão de casos de salmonelose ocorrem a cada ano nos Estados Unidos (Scallan et al., 2011) e entre 200 milhões a 1,3 bilhão de casos em todo o mundo (Coburn et al., 2007). *Salmonella* Enteritidis representa 85% dos casos de salmonelose na Europa, 38% na Ásia e 31% na América Latina e no Caribe (Cardoso, 2013).

Cerca de oitocentos tipos de produtos de origem animal estão envolvidos em intoxicações alimentares causadas por *Salmonella*, destacando-se a carne de frango, os ovos e seus derivados (Longo et al., 2010). No Brasil, os ovos e seus derivados são o terceiro alimento responsável por casos de doenças transmitidas por alimentos (DTA), enquanto a carne de frango e seus derivados ocupam a oitava posição (Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS, 2014).

Uma das principais formas de contaminação das aves é o contato com a *Salmonella* nas granjas, através do consumo da ração contaminada. Esta contaminação é transferida para a carcaça durante o processamento, tornando a carne de frango uma das principais formas de contaminação para o homem (Longo et al., 2010; Mead et al., 2010). Os alimentos cárneos de origem animal podem ser contaminados, ainda, durante o transporte, manipulação e armazenamento, enquanto os ovos podem sofrer contaminação transovariana por *Salmonella* durante sua formação. Neste caso, a contaminação é transmitida via corrente sanguínea para o ovário (Peresi et al., 1998; Mead et al., 2010). A ocorrência e a concentração de

32 *Salmonella* na carne variam de acordo com as condições de manejo durante a criação  
33 do animal (Carvalho e Cortez 2005). Além desse micro-organismo, outros  
34 enteropatógenos, como *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* e  
35 *Campylobacter* sp. podem tornar os alimentos fontes primárias de contaminação  
36 (Stanley e Jones, 2003).

37 Já as espécies de *Lactobacillus* (*crispatus*, *reuteri* e *salivarius*) são colonizadoras  
38 autóctones do trato gastrointestinal de frangos de corte, presentes desde a primeira  
39 semana de vida (Hilmi et al., 2007) das aves, desempenhando papel importante na  
40 nutrição, desempenho e prevenção de doenças, como a enterite necrótica, provocada  
41 por *Clostridium perfringens* no trato gastrointestinal (Stephenson et al., 2010). Os  
42 *Lactobacillus* são bactérias produtoras do ácido láctico, atuando também no controle de  
43 *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis e *Campylobacter jejuni*, muito utilizados  
44 como probióticos para humanos e animais (Wali e Beal, 2011), reduzindo a incidência  
45 de doenças intestinais.

46 É indispensável para o comércio nacional e internacional o controle desses  
47 patógenos nas granjas e, conseqüentemente, na carne de frango e outros produtos  
48 avícolas. Na legislação brasileira, o Programa de redução de patógenos e  
49 monitoramento microbiológico e o controle de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos  
50 e perus está regulamentado pela Instrução Normativa nº 78, de 03 de novembro de  
51 2003 (MAPA), que aprova as Normas Técnicas para Controle e Certificação de Núcleos  
52 e Estabelecimentos (Tessari et al., 2008).

53 O uso de antibióticos como melhoradores de desempenho na produção animal  
54 vem sendo restringido, devido aos riscos de surgimento de micro-organismos  
55 resistentes a estes antibióticos (Santos et al., 2009), além de possíveis resíduos que  
56 podem contaminar a carcaça, acarretando em prejuízo econômico em muitos setores  
57 da agroindústria. A Comunidade Europeia (CE) eliminou progressivamente e proibiu,  
58 em 1º de janeiro de 2006, a comercialização e utilização de antibióticos como  
59 melhoradores de desempenho (Huyghebaert et al., 2011). Com isso, o Brasil passou a  
60 proibir o uso de alguns antibióticos (virginiamicina, tilosina, espiramicina, tetraciclina,  
61 quinolonas, eritromicina e avoparcina) na produção de animais destinados ao consumo  
62 humano (MAPA, 2013). Por estes motivos, na última década, um dos grandes desafios

63 das indústrias foi a busca por aditivos alimentares para os animais que substituíssem os  
64 antibióticos melhoradores de desempenho (Lee et al., 2003; Huyghebaert et al., 2011,  
65 Borges et al., 2014), na tentativa de inibir o crescimento de micro-organismos  
66 patogênicos presentes na ração e no trato digestório dos animais (Van Immerseel et al.,  
67 2006), melhorando o desempenho animal.

68 Na busca por alternativas aos antibióticos, desde de 1990 aumentou-se o  
69 interesse por melhoradores de desempenho à base de plantas, uma vez que estes são  
70 quimicamente distintos dos antibióticos, com grande potencial antimicrobiano (Brenes e  
71 Roura, 2010), atendendo à demanda do consumidor por produtos sem aditivos  
72 químicos, mas com vida útil prolongada (Belda-Galbis et al., 2014) e sem causar  
73 prejuízos ao desempenho animal (Dibner e Richards, 2005). Com isso, novos aditivos  
74 com potencial antimicrobiano vêm sendo difundidos na cadeia produtiva, como por  
75 exemplo, os óleos essenciais e os ácidos orgânicos de origem natural incluídos na dieta  
76 de aves e suínos (Shan et al., 2007, Windisch et al., 2008).

77 Os óleos essenciais (OEs), também chamados óleos voláteis, são líquidos e  
78 aromáticos, obtidos a partir de material vegetal (flores, brotos, sementes, folhas, galhos,  
79 cascas, ervas, madeira, frutos e raízes) (Picone et al., 2013). OEs são misturas  
80 complexas (fenilpropenos e terpenos, entre outros) de baixo ponto de ebulição,  
81 associados com essências de plantas com aromas característicos, definidos como  
82 "ervas e especiarias" (Brenes e Roura, 2010; Fonseca, 2012). Eles são metabólitos  
83 secundários que desempenham papel fundamental na proteção das plantas contra  
84 ataques de insetos, doenças bacterianas ou fúngicas (Haramoto e Gallandt, 2004).

85 A utilização de extratos herbais é considerada uma abordagem complementar ou  
86 alternativa à medicina convencional (alopatia) e tem recebido maior atenção como  
87 melhoradores de desempenho animal na última década (Cravotto et al., 2010). O  
88 isotiocianato de alila (ITA) e o carvacrol (CV) são os principais componentes dos óleos  
89 essenciais de mostarda e orégano, respectivamente, e têm sido muito utilizados como  
90 antimicrobianos em outros estudos (Zhang, 2004; Chen e Andreasson, 2001; Olaimat e  
91 Holley, 2013), com grande potencial para o uso na dieta animal.

92 Os ácidos orgânicos, constituintes normais de plantas ou de tecidos de origem  
93 animal (Huyghebaert et al., 2011), vêm sendo empregados há muitos anos como

94 aditivos conservantes de alimentos e melhoradores de desempenho animal, prevenindo  
95 e minimizando infecções causadas por bactérias patogênicas na produção de aves e  
96 suínos. Nesta categoria de aditivos, encontram-se os ácidos graxos de cadeia curta  
97 (propiónico, fórmico, acético, cítrico, láctico, benzoico, butírico e fumárico) e os ácidos  
98 graxos de cadeia média (cáprico, caprílico, caproico e láurico) (Borosky, 2011). Eles  
99 são componentes de numerosos óleos de origem animal e vegetal, não apresentam  
100 toxicidade para os humanos e são reconhecidos como "seguros" pelos órgãos  
101 governamentais (Hinton e Ingram, 2011).

102 A aplicabilidade desses compostos (óleos essenciais e ácidos orgânicos) está  
103 associada ao seu efeito inibidor sobre o desenvolvimento de bactérias indesejáveis no  
104 alimento e no trato gastrointestinal (Burt et al., 2007; Borosky, 2011). Os ácidos  
105 orgânicos podem melhorar a digestibilidade e a palatabilidade da dieta, melhorando  
106 assim a conversão alimentar e o crescimento dos animais, principalmente aves e  
107 suínos (Van Immerseel et al., 2006), controlando a incidência de patógenos intestinais  
108 (Van Immerseel et al., 2005).

109 Os óleos essenciais e os ácidos orgânicos têm sido eficientes em inibir a  
110 proliferação de micro-organismos patogênicos, quando adicionados à dieta dos animais  
111 (Borosky, 2011; Bona et al., 2012). No entanto, se considerarmos a complexidade e o  
112 custo de ensaios *in vivo* (Giuberti et al., 2011), uma abordagem interessante para  
113 verificar os efeitos antimicrobianos dos compostos naturais no trato digestório de  
114 frangos de corte é a simulação da digestão *in vitro*. Esta evita o uso de animais e utiliza  
115 modelos laboratoriais que simulam o trato digestório (Avantaggiato et al., 2003) em  
116 condições gastrointestinais similares ao modelo *in vivo*, avaliando seus efeitos sobre a  
117 microbiota intestinal, em diferentes compartimentos do trato digestório (Michiels et al.,  
118 2007).

119 Apesar dos óleos essenciais serem considerados potentes antimicrobianos, não  
120 é possível afirmar que estas substâncias sejam realmente efetivas em uma simulação  
121 de digestão, por apresentarem elevada volatilidade e baixa solubilidade em água, o que  
122 pode dificultar sua aplicação (Chacon et al., 2006; Pickler et al., 2012). Já os ácidos  
123 orgânicos apresentam elevada capacidade de dissociação em meios líquidos (Viola e  
124 Vieira, 2007), o que pode facilitar sua utilização durante a simulação. Diante do exposto

125 acima, o presente trabalho teve como objetivo determinar a CIM dos óleos essenciais  
126 (OE), e ácidos orgânicos (AO), isolados e em combinação, contra *Salmonella*  
127 Enteritidis; avaliar o efeito antimicrobiano da combinação de OE e AO contra *S.*  
128 Enteritidis em ração de frango e avaliar o efeito da combinação de OE e AO contra *S.*  
129 Enteritidis e contra *Lactobacillus plantarum* em ração de frango durante digestão  
130 simulada *in vitro*.

131

132

133

134 CAPÍTULO 2

135

136 **2 REVISÃO DA LITERATURA**

137

138 **2.1 *Salmonella* Enteritidis: Características morfofisiológicas**

139

140 O gênero *Salmonella* é composto por duas espécies, *Salmonella enterica* e  
141 *Salmonella bongori*, sendo a *Salmonella enterica* dividida em seis subespécies: *S.*  
142 *enterica enterica*, *S. enterica salamae*, *S. enterica arizonae*, *S. enterica diarizonae*, *S.*  
143 *enterica houtenae* e *S. enterica indica* (Guibourdenche et al., 2010; Issenhuth-Jeanjean  
144 et al., 2014).

145 As bactérias do gênero *Salmonella* são bacilos Gram-negativos em forma de  
146 bastonetes, da família Enterobacteriaceae, anaeróbicas facultativas, não formadoras de  
147 esporos. Apresentam as enzimas catalase-positiva e oxidase-negativa. Além disso, são  
148 redutoras de nitrato a nitrito, produzem gás sulfídrico (H<sub>2</sub>S), não fermentam lactose e  
149 são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono (Castilla, 2003; Silva et  
150 al., 2010). São móveis com flagelos peritríquios, capazes de descarboxilar os  
151 aminoácidos lisina e ornitina, medem de 0,7 a 1,5 µm de diâmetro e 2,0 a 5,0 µm de  
152 comprimento, crescem em temperatura ótima de 37°C, mas podem sobreviver em  
153 temperaturas entre 5 e 45°C, sendo a atividade mínima de água para seu crescimento  
154 de 0,93 a 0,96, e a faixa de pH ideal para essas bactérias de 6 a 7, mas podem  
155 sobreviver em pH de 4 a 9 (Fortuna e Franco, 2005).

156 O presente número de sorovares por espécies e subespécies registrados até o  
157 presente momento é 2.659 sorotipos de *Salmonella enterica* subsp. *enterica*, no qual  
158 mais de 50% pertence à subespécie entérica (Issenhuth-Jeanjean et al., 2014). Os  
159 sorotipos pertencentes a *S. enterica* foram classificados de acordo com a região em  
160 que foram isolados pela primeira vez (Tindall et al., 2005).

161 Nos EUA, os tipos mais comuns de fagotipos *Salmonella enterica* relatados  
162 desde 1988 foram: tipo 8 (48,2%), 13-A (20,1%), 13 (7,8%) e 14b (7,8%), enquanto em  
163 países da Europa os tipos mais comuns relatados foram os fagotipos tipo 4 (PT 4)  
164 (Hickman-Brenner et al., 1991; Threlfall et al., 1994 e 2014). No Brasil, 18 dos 60 tipos

165 S. Enteritidis foram fagotipo tipo 4 (PT 4) e apresentaram o mesmo perfil de fagotipos  
166 registrados em países Europeus, os estudos epidemiológicos, incluindo a fagotipagem  
167 e a sonda complementar de RNAr, sugerem que a entrada de SE no Brasil ocorreu no  
168 final da década de 80 (Silva e Duarte 2002). Provavelmente, a presença destes  
169 patógenos no Brasil está associada à importação de matrizes de aves trazidas dos  
170 países da Europa (Irino et al., 1996; Campioni et al., 2014). Desde então, esse  
171 patógeno tem ocasionado prejuízos à avicultura brasileira e, como zoonose, tem  
172 importantes consequências também para a saúde pública (Kottwitz et al., 2012).

173

## 174 **2.2 Panorama e ocorrência de *Salmonella* Enteritidis na avicultura**

175

176 O Brasil é considerado atualmente o segundo maior produtor e o maior  
177 exportador de carne de frango do mundo e ocupa a sétima posição no ranking mundial  
178 de produção de ovos (ABPA, 2015). Em 2014, o Brasil exportou 4,1 milhões de  
179 toneladas de carne de frango para cerca de 150 países importadores, arrecadando  
180 aproximadamente 8 bilhões de dólares em receita de exportação. Segundo dados do  
181 IBGE (2014), o estado do Paraná é o maior produtor de frangos do país, o que implica  
182 em atender as exigências dos consumidores internos e externos, tanto no que se refere  
183 à sanidade avícola, quanto à qualidade dos alimentos comercializados (Kottwitz et al.,  
184 2012). Para se adequar às exigências do mercado internacional e garantir os altos  
185 índices de produção e exportação de produtos avícolas são necessárias medidas de  
186 prevenção e controle de agentes causadores de enfermidades infecciosas em aves  
187 comerciais como, por exemplo, a *Salmonella* Enteritidis.

188 A contaminação por *Salmonella* spp. pode ser classificada em vertical, horizontal  
189 ou cruzada. A contaminação vertical das aves por *Salmonella* spp. pode ser iniciada  
190 pela contaminação do ovo no trato reprodutivo através da corrente sanguínea ou ao  
191 passar pela cloaca, através do contato com as fezes, aumentando o índice de eclosão  
192 de pintainhos contaminados (Boni et al., 2011). A contaminação horizontal ocorre por  
193 via oral, pois a água e as rações contaminadas são importantes veículos de  
194 disseminação (Boni et al., 2011; Sousa, 2012) ou via fecal. Por sua vez, os casos de  
195 contaminações cruzadas são mais comuns durante os procedimentos de abate,

196 transporte e armazenamento e processamento das carcaças (Moraes et al., 2014) e  
197 variam de acordo com as condições de manejo durante a criação e os cuidados  
198 higiênicos adotados nos processos de abate dos animais (Carvalho e Cortez, 2005).

199 A ave infectada poderá ser portadora assintomática ou apresentar queda de  
200 produtividade, infertilidade, piora na conversão alimentar e morte (Gama et al., 2003).  
201 São conhecidas três enfermidades importantes: a pulorose, cujo agente é a *Salmonella*  
202 *Pullorum* (SP); o tifo aviário, causado pela *Salmonella Gallinarum* (SG); e o paratifo  
203 aviário, causado pela *Salmonella Typhimurium* (ST) e *Salmonella Enteritidis* (SE), que  
204 podem causar diarreias, elevado índice de mortalidade, baixa taxa de natalidade e  
205 queda na produtividade (Sousa, 2012; Vaz et al., 2015; Muniz et al., 2015) repercutindo  
206 em perda de eficiência produtiva.

207 A SE é causadora da salmonelose, uma doença que provoca gastroenterite  
208 aguda, febre entérica, diarreia e vômitos, resultantes da colonização bacteriana  
209 intestinal, por contaminação de origem alimentar (Silva-Hidalgo et al., 2012). Por estes  
210 motivos, a salmonelose é considerada uma zoonose de importância mundial que  
211 preocupa as autoridades sanitárias por causar grandes prejuízos econômicos ao  
212 agronegócio brasileiro (Bona et al., 2012). No entanto, a prevenção e o controle de SE  
213 depende da sua adequada detecção e de sua caracterização nos animais, além de  
214 tratamento com antimicrobianos eficazes (Kottwitz et al., 2012).

215 Os antibióticos melhoradores de desempenho animal utilizados em doses  
216 subterapêuticas, foi visto durante décadas como um grande avanço tecnológico. No  
217 entanto, a utilização incorreta dos antibióticos (Moraes et al., 2014), pode ter  
218 contribuído para a propagação de bactérias com genes resistentes a antibióticos,  
219 promovendo a seleção de bactérias resistentes a tratamentos terapêuticos em animais  
220 e humanos, além disso, os resíduos de antibióticos deixados em produtos derivados de  
221 animais pode resultar em maior difusão desse composto no ambiente (Van Immerseel  
222 et al., 2008). A *S. Enteritidis* é uma das bactérias que se difundir com a intensificação  
223 da produção de aves e o uso indiscriminado de antibióticos na ração animal (Cardoso,  
224 2013; Pandini et al., 2014). Nas duas últimas décadas, diversos países têm relatado  
225 aumento no número de surtos-epidêmicos ocasionados por *S. Enteritidis* e perdas na  
226 produtividade e devido ao surgimento de doenças, constituindo-se na maior causa de

227 surtos de enfermidades transmitidas por alimentos nos EUA, Reino Unido e Europa  
228 Central (Van Immerseel et al., 2008; Cardoso, 2013; Pandini et al., 2014).

229 Por este motivo, algumas medidas vêm sendo estabelecidas nas indústrias para  
230 o controle da propagação de *Salmonella* no setor avícola (Ravagnani et al., 2012),  
231 como por exemplo, a irradiação. Este método pode controlar *Salmonellas* e outros  
232 agentes físicos encontrados na carne de frango, ovos e na ração, da mesma maneira  
233 que o uso de desinfetantes químicos pode auxiliar no controle de *Salmonella* nas  
234 instalações (Bonatti e Monteiro, 2008; Sousa, 2012). Dentre todos os métodos  
235 estabelecidos para controle e erradicação de bactérias, podemos destacar a  
236 importância da exploração do potencial antimicrobiano dos compostos de origem  
237 natural (Bona et al., 2012), para contribuir com as melhorias da produtividade na  
238 avicultura, garantindo a biossegurança das granjas produtoras.

239

### 240 **2.3 *Lactobacillus* sp: Características morfofisiológicas**

241

242 As bactérias do gênero *Lactobacillus* são, gram-positivas, anaeróbias e em forma  
243 de bastonete. As espécies de *Lactobacillus* são colonizadoras autóctones do trato  
244 gastrointestinal de frangos de corte, presentes desde a primeira semana de vida das  
245 aves (Hilmi et al., 2007), desempenhando papel importante na nutrição, e prevenindo  
246 doenças, como a enterite necrótica, e o paratifo aviário (Vaz et al., 2015). Além disso,  
247 os *Lactobacillus* são muito utilizados como probióticos para humanos e animais são  
248 bactérias produtoras do ácido láctico, que inibe o crescimento de bactérias (*Salmonella*  
249 *Typhimurium*, *Salmonella* *Enteritidis* e *Campylobacter jejuni*), (Wali e Beal, 2011),  
250 reduzindo a incidência de doenças intestinais.

251 Estudos vêm sendo realizados para avaliar a sobrevivência de espécies de  
252 *Lactobacillus* durante a passagem pelo trato gastrointestinal de frangos, reduzindo a  
253 presença de bactérias patogênicas (Stephenson et al., 2010). Em uma simulação do  
254 trato digestório de frangos de corte, foi demonstrado que, além de sobreviver às  
255 condições intestinais, as populações de *Lactobacillus* inibiram o crescimento de  
256 *Campylobacter jejuni* e *Salmonella* *Typhimurium*. (Chang e Chen, 2000; Wali e Beal,  
257 2011). A presença de bactérias lácticas pode inibir o crescimento de micro-organismos

258 indesejáveis no trato gastrintestinal, competindo com micro-organismos patógenos e  
259 contribuindo com a produção de frangos de corte.

260 Desde a retirada dos antibióticos melhoradores de desempenho da ração de  
261 frangos na Europa, a incidência de doenças entéricas causadas por bactérias  
262 patogênicas tem aumentado (Van Immerseel et al., 2008), além de grandes perdas na  
263 produção de aves e suínos (Casewell et al., 2003). Por conseguinte, existe necessidade  
264 de desenvolver métodos alternativos para controlar a presença de agentes causadores  
265 de doenças no trato gastrintestinal de frangos. Dentre as alternativas para reduzir a  
266 contaminação por micro-organismos indesejavéis, destacam-se a suplementação da  
267 ração de frangos com probióticos contendo espécies de *Lactobacillus*. Estes vêm sendo  
268 utilizados no controle de bactérias patogênicas presentes no trato gastrintestinal de  
269 frangos, particularmente no papo e no intestino delgado (Stephenson et al., 2010),  
270 modificando o pH e prevenindo infecções.

271

## 272 **2.4 Anatomia e fisiologia do sistema digestório de frangos**

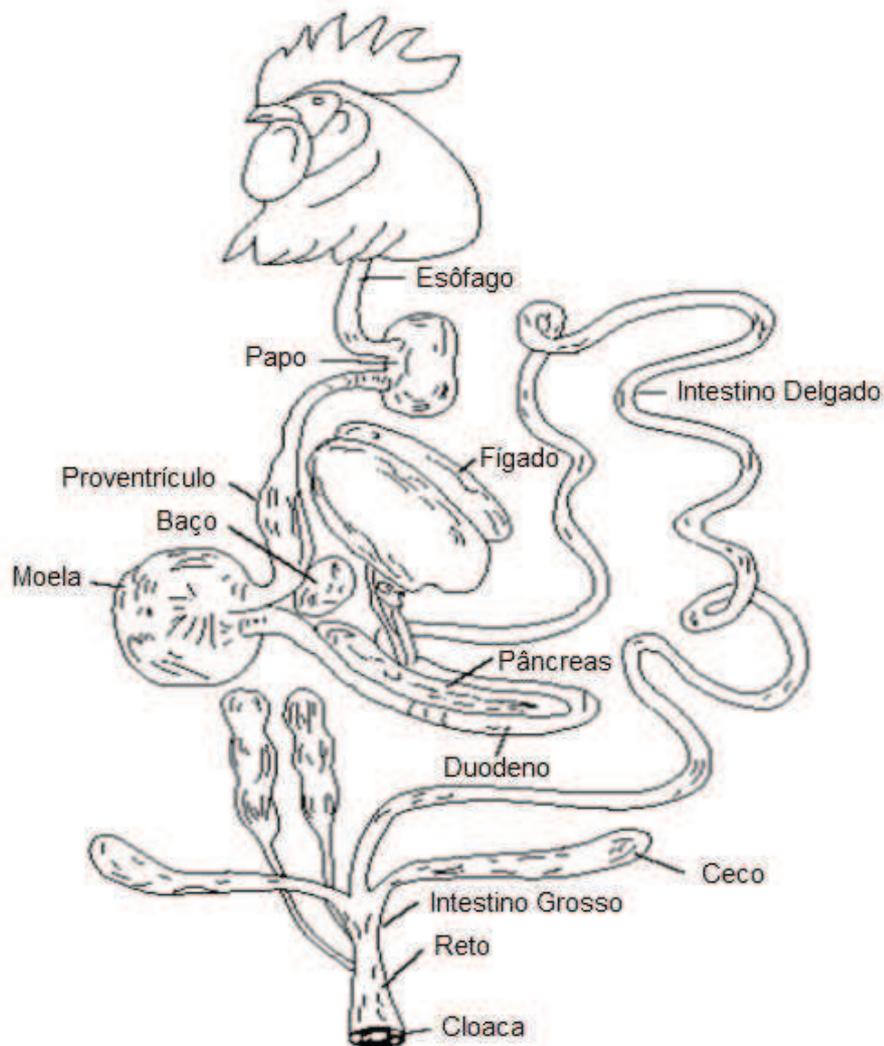
273

274 As aves dependem da obtenção adequada de energia e outros nutrientes (água,  
275 minerais, lipídios, carboidratos, vitaminas e aminoácidos) para maximização do  
276 desempenho. Entretanto, para que isso ocorra, o sistema digestório deve apresentar,  
277 além do equilíbrio microbiológico, características estruturais e fisiológicas que  
278 possibilitem a ingestão e a passagem do alimento pelo trato, alterações físicas e  
279 químicas na degradação do alimento e a absorção dos produtos da digestão (Franco,  
280 2009; Boaro, 2009; Fernandes, 2012; Luegas et al., 2015). Neste sentido, há a  
281 necessidade do conhecimento dos processos e atividades fisiológicas das aves, para  
282 obtenção de melhor desempenho produtivo.

283 O sistema digestório dos frangos de corte é formado por cavidade oral (bico,  
284 língua e glândulas salivares), orofaringe, esôfago, papo, estômago químico  
285 (proventrículo), estômago mecânico (moela), duodeno, jejuno, íleo, cecos (pares), cólon  
286 e reto, que termina na cloaca, comum ao sistema urogenital (Boaro, 2009) (Figura 1).

287 Na cavidade oral, existe um conjunto de glândulas salivares (submandibulares  
288 lingual, palatina e maxilar) que secretam saliva suficientemente para umidificar e

289 auxiliar a deglutição do alimento. A faringe restringe-se a um curto segmento que une a  
290 cavidade oral ao esôfago e que contém a abertura da laringe (glote), abertura para  
291 cavidade nasal (coanas) e abertura para o ouvido (infundibular) (Franco, 2009; Boaro,  
292 2009).



293  
294 Figura 1. Sistema Digestório da ave: esôfago, papo, proventrículo, moela, intestino delgado  
295 (duodeno, jejuno e íleo) intestino grosso (ceco, reto), cloaca, fígado e pâncreas.  
296 Fonte: Moran (1982).

297  
298 O esôfago é um tubo longo, localizado entre a orofaringe e a parte glandular do  
299 estômago (pró-ventrículo). Possui paredes finas e dilatáveis com grande capacidade de  
300 distensão e tem por função conduzir o bolo alimentar da orofaringe para o proventrículo.

301 Apresenta glândulas mucosas que secretam muco para amolecer os alimentos (Gary e  
302 Duke, 1988).

303 O esôfago localiza-se caudalmente à quinta vértebra cervical, no lado direito do  
304 pescoço, entre a veia jugular, o vago e o timo, na parte dorsal e a traqueia, na parte  
305 ventral. Na entrada torácica, sua parede ventral expande-se e forma um divertículo  
306 sacular ímpar, denominado papo ou inglúvio (Gurtler et al., 1987; Boaro, 2009). O papo  
307 é um órgão primariamente de armazenamento temporário de alimento e está localizado  
308 em posição ventrolateral ao esôfago e cranialmente à clavícula e músculos peitorais. As  
309 superfícies internas do esôfago e do papo possuem pregas longitudinais e estão  
310 revestidas por epitélio estratificado pavimentoso. No papo, entretanto, estão presentes  
311 glândulas mucosas apenas próximo ao esôfago (Getty, 1987). Este compartimento  
312 permite que as aves consumam grande quantidade de ração em um curto período e  
313 façam a digestão posteriormente, se necessário (Boaro, 2009).

314 As principais funções do papo consistem no armazenamento do alimento e na  
315 regulação do enchimento gástrico, ocorrendo o amolecimento e umedecimento do  
316 alimento pela saliva. A secreção do papo contém predominantemente muco, não sendo  
317 encontradas enzimas (amilase) em quantidades significativas para a digestão, porém  
318 pode apresentar enzimas provenientes do refluxo dos conteúdos do pró-ventrículo  
319 (Gurtler et al., 1987) ou pequena atividade microbiana, devido a presença de bactérias  
320 lácticas (Wali e Beal, 2011).

321 O estômago glandular ou proventrículo é um órgão alongado em formato de fuso,  
322 localizado na cavidade torácica, com comprimento médio de 5 cm. A parede glandular  
323 do proventrículo é mais espessa que a do esôfago; a parte interna é revestida por um  
324 epitélio simples colunar, com dois tipos de glândulas predominantes, a mucosa simples  
325 que secreta muco e a composta que secreta muco e pepsinogênio. As glândulas são  
326 bem desenvolvidas e desembocam em grupo na superfície da mucosa, sendo as  
327 glândulas compostas homólogas às células parietais e principais, se comparado com o  
328 estômago dos mamíferos.

329 A principal função das células do proventrículo é a produção de suco gástrico e  
330 pepsinogênio, e o seu baixo pH, em torno de 2,5, inibe o crescimento de patógenos,  
331 além de ativar enzimas proteolíticas como a pepsina (Getty, 1987). As galinhas

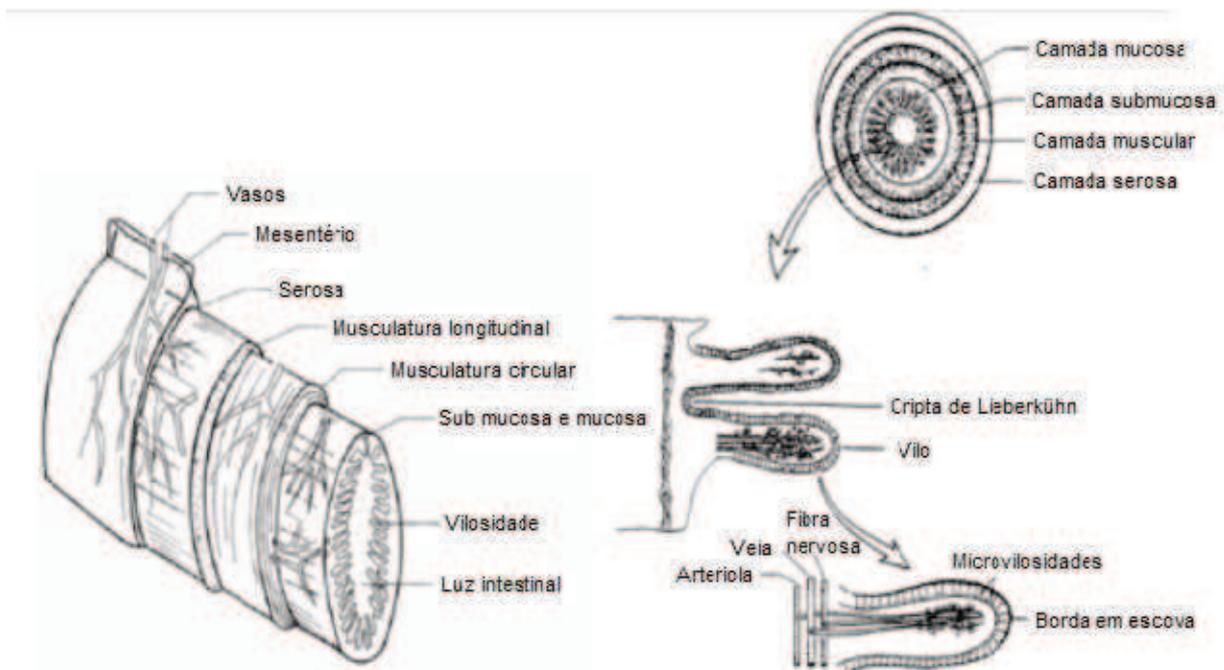
332 secretam cerca de 8,8 mL de suco gástrico por kg de peso vivo por hora, e a produção  
333 total de pepsina é de 2.430 U/kg de peso corporal por hora (Gary e Dukes, 1988).  
334 Como o tempo de permanência do alimento no proventrículo é muito curto, de 30 a 60  
335 minutos, essa quantidade elevada de secreção gástrica permite que o alimento seja  
336 rapidamente embebido por pepsina e ácido clorídrico e, dessa forma, direcionado para  
337 a moela (Gary e Dukes, 1988).

338 O estômago muscular das aves recebe o nome de moela e sua parede é  
339 formada por uma musculatura forte, que permite intensas contrações musculares. Sua  
340 superfície interna é revestida por um epitélio simples colunar e sobre a superfície  
341 epitelial há uma resistente membrana pregueada. A camada muscular consiste em dois  
342 pares de músculos lisos, que envolvem a cavidade gástrica através de dois músculos  
343 principais, um superior e um inferior, unidos por um músculo intermediário (Gurtler et  
344 al., 1987). Na moela, as fortes contrações rítmicas ocorrem de três a quatro vezes por  
345 minuto (Boaro, 2009).

346 As principais funções da moela consistem na trituração e no umedecimento dos  
347 grãos que chegam após a deglutição, ou após o armazenamento temporário no papo.  
348 Este processo de trituração pode ser potencializado por fragmentos de pedras e seixos  
349 ingeridos pelas aves. Além da trituração, as contrações aumentam o contato do  
350 alimento com o ácido clorídrico e a pepsina, ambos oriundos do proventrículo, ou  
351 podem promover o retorno do alimento para o pró-ventrículo, para ser novamente  
352 embebido, através de movimentos peristálticos inversos (Getty, 1987).

353 O intestino delgado possui cerca de 1,5 metro e é composto por três regiões  
354 (duodeno, jejuno e íleo), e seu pH varia de 5,6 a 7,2, dependendo da composição da  
355 dieta (Bertechini, 1998; Gatty, 1986; Gary e Duke, 1988). O duodeno é a primeira  
356 porção do intestino delgado, o jejuno é a parte mais longa do intestino delgado e  
357 encontra-se disposto em várias alças. O divertículo vitelino ou divertículo de Meckel  
358 delimita a antiga ligação com o saco vitelino. O íleo continua a partir do jejuno, sem  
359 delimitação definida, sendo invariavelmente descrito como iniciado no divertículo  
360 vitelino, ou oposto aos ápices dos cecos e delimitado posteriormente pelo ponto de  
361 ligação cecocólico (Boaro, 2009).

362 A parede do intestino das aves, assim como todo o trato gastrintestinal, é  
363 constituída por uma camada serosa, muscular, submucosa e mucosa (Figura 2). A  
364 mucosa intestinal possui longos vilos e está revestida por um epitélio simples colunar.  
365 Os vilos intestinais são constituídos por três tipos de células, funcionalmente distintas:  
366 enterócitos, células caliciformes e as células enteroendócrinas. Os enterócitos são  
367 células responsáveis pelo transporte de nutrientes transepitelial do lúmen para corrente  
368 sanguínea (Gurtler et al., 1987; Gary e Duke, 1988). As células caliciformes são  
369 secretoras de glicoproteínas e muco, que tem a função de proteger o epitélio intestinal  
370 da ação de enzimas digestivas e dos efeitos abrasivos da digesta (Maiorka, 2004). As  
371 células enteroendócrinas são produtoras de hormônios peptídicos (secretina e  
372 colecistoquinina) e essas substâncias participam na regulação da digestão, absorção e  
373 utilização dos nutrientes (Getty, 1987; Boaro, 2009).  
374



375  
376 Figura 2. Estrutura geral das tunicas que constituem a parede do intestino das aves (Boaro,  
377 2009).

378 Na porção ascendente do intestino delgado, abrem-se os ductos biliares, que  
379 secretam ácidos que degradam e emulsificam os lipídios. A secreção do suco  
380 pancreático, por sua vez, é estimulada pela presença de secretina no lúmen intestinal.

381 Na primeira fase da digestão, ocorre a liberação de bicarbonato que atua na regulação  
382 do pH intestinal e, posteriormente, há a secreção de enzimas como amilase, lipase e  
383 tripsina, liberadas através do ducto pancreático, além de sacarase, maltase,  
384 aminopeptidase e dipeptidase, secretadas pelas bordas em escova do intestino delgado  
385 (Gurtler et al., 1987).

386 O intestino grosso consiste em um par de cecos e um cólon curto, além do reto  
387 contínuo com íleo e cloaca. Na literatura, existem divergências quanto à nomenclatura  
388 estrutural do intestino grosso das aves. Os cecos, relativamente longos nas galinhas e  
389 perus, originam-se na junção ileocecocólica e seguem trajetos opostos ao lado do íleo,  
390 ao qual se fixam por pregas ileocecais. No ceco, ocorre a maior parte da degradação  
391 dos nutrientes pela atividade das bactérias (*Lactobacillus* e *Streptococcus*) presentes  
392 (Gurtler et al., 1987).

393 A presença de vilos no intestino grosso ainda é discutida e acredita-se que está  
394 presente apenas na parte proximal do ceco. A túnica mucosa do ceco forma apenas  
395 pregas, com paredes finas, constituídas de tecidos linfoides (Gurtler et al., 1987). Este  
396 compartimento possui menor número de células caliciformes, menor quantidade de  
397 glândulas e parede mais grossa comparada ao intestino delgado. O reto curto situa-se  
398 próximo ao meio da cavidade abdominal e estende-se caudalmente como um tubo,  
399 quase reto, até a cloaca. A túnica mucosa do reto é semelhante a do intestino delgado,  
400 com maior número de células caliciformes (Getty, 1987; Boaro, 2009).

401 O intestino grosso das aves apresenta pequena capacidade para a digestão das  
402 fibras e grande capacidade para absorção de água e eletrólitos. É observada a síntese  
403 microbiana de vitaminas, mas aparentemente são pouco absorvidas. O esvaziamento  
404 ocorre através de ondas peristálticas que se iniciam no ceco proximal, atravessando o  
405 reto e sendo excretada junto à cloaca (Gary e Duke, 1988; Franco, 2009).

406

## 407 **2.5 Utilização de agentes antimicrobianos naturais**

408

### 409 **2.5.1 Características e mecanismo de ação dos ácidos orgânicos**

410

411 Desde a proibição do uso de antibióticos como melhoradores de desempenho na  
412 alimentação animal, os ácidos orgânicos destacam-se como alternativas nas dietas de  
413 frangos de corte (Ricke, 2003; Maiorka et al., 2004). Dentre os ácidos orgânicos  
414 empregados na nutrição animal, os de cadeia curta, como o propiônico, com 4  
415 carbonos, e os de cadeia média, como o caproico, com 6 carbonos, pertencem ao  
416 grupo de ácidos carboxílicos (R-COOH) (Zygmunt e Banel, 2009). Estes ácidos são  
417 amplamente distribuídos na natureza como componentes naturais de vegetais e tecidos  
418 animais (Costa et al., 2013). Além disso, são obtidos através da fermentação de  
419 carboidratos, proteínas, gorduras e matéria orgânica no trato gastrointestinal dos animais  
420 e humanos, realizada estritamente pela microbiota anaeróbia predominante no  
421 intestino, e constituem parte importante do suprimento energético dos animais  
422 hospedeiros (Ricke, 2003; Zygmunt e Banel, 2005; Costa et al., 2013).

423 Uma importante característica dos ácidos orgânicos é o seu potencial de  
424 dissociação, expresso em valores de pKa, no qual Ka é a constante de dissociação, no  
425 caproico e propiônico esses valores são de 4,88 e 4,87 respectivamente. A eficiência  
426 dos ácidos na inibição de micro-organismos depende do seu valor de pKa, que é o pH  
427 em que 50% do ácido será dissociado (Viola e Vieira, 2007; Costa et al., 2013). Sua  
428 inclusão na alimentação animal é de grande importância pela capacidade em reduzir o  
429 pH dos alimentos (Franco, 2009), inibindo o desenvolvimento de micro-organismos  
430 indesejáveis em matérias-primas e rações como *Salmonella* e *Escherichia coli*  
431 causadoras de doenças (Sterzo et al., 2007).

432 Todos os micro-organismos apresentam uma faixa de pH ideal para se  
433 desenvolver, e a alteração do pH pode reduzir a sua capacidade de colonização  
434 intestinal (Viola, 2006). Na forma dissociada os ácidos orgânicos não são capazes de  
435 atravessar a membrana celular bacteriana, porém, liberam no interior do intestino íons  
436 H<sup>+</sup>, provocando a redução do pH atuando como uma química barreira contra  
437 colonização bacteriana (Van Immerssel et al., 2004; Mroz, 2005).

438 Na forma não dissociada, o mecanismo de ação dos ácidos orgânicos sobre o  
439 desenvolvimento microbiológico intestinal ocorre devido à sua capacidade de penetrar a  
440 parede celular bacteriana (*Salmonella* spp., *Escherichia coli* e *Listeria* spp., dentre

441 outras) e alterar as suas funções normais (Van Immerseel et al., 2006; Pickler et al.,  
442 2012; Suryanarayana et al., 2012).

443 Na forma não dissociada, os ácidos orgânicos são lipofílicos, reagindo e  
444 difundindo de forma passiva através da membrana celular de bactérias gram-negativas,  
445 para o interior do citoplasma. Dentro da célula, o ácido se dissocia, liberando íons de  
446 hidrogênio, o que conseqüentemente reduz o pH intracelular, acidificando o citoplasma  
447 resultando na alteração do gradiente de concentração de prótons, suprimindo o sistema  
448 enzimático, transporte de nutrientes, síntese de aminoácidos, ATP e DNA (Mroz, 2005;  
449 Pickler et al., 2012). Outro efeito atribuído ao acúmulo de ânions no interior da célula é  
450 a diminuição da polaridade da membrana (Ricke, 2003; Viola e Vieira, 2007),  
451 aumentando a difusão dos ácidos para o citoplasma (Mani-Lopez et al., 2012).

452 A regulação do pH intracelular é extremamente importante para a sobrevivência  
453 dos micro-organismos, sendo realizada através do mecanismo de homeostase e trocas  
454 iônicas (Sterzo et al., 2007; Vilas Boas, 2014). Os ânions dos ácidos que se difundem  
455 livremente por meio da parede celular, tornam-se tóxicos para a bactéria mediante aos  
456 mecanismos complexos que implicam no desequilíbrio aniônico, resultando em  
457 problemas osmóticos internos (Bassan et al., 2008). O desequilíbrio provoca acúmulo  
458 excessivo de sódio (Na<sup>+</sup>), potássio (K<sup>+</sup>) ou glutamato, aumentando a pressão mecânica  
459 sobre a parede celular do micro-organismo, o que faz com que essa se rompa  
460 causando a morte celular (Van Immerseel et al., 2006; Viola, 2006). Além disso, o  
461 metabolismo microbiano é dependente da atividade de enzimas, que é inibida pelo  
462 baixo pH intracelular. Para restabelecer o equilíbrio, a bactéria usa energia na forma de  
463 ATP para eliminar prótons através da membrana, pela bomba de H<sup>+</sup> - ATPase  
464 (Lückstädt e Mellor, 2011), consumindo toda energia produzida, provocando  
465 esgotamento energético e a morte bacteriana (Vilas Boas, 2014).

466 Como mecanismo de sobrevivência, muitas bactérias fermentativas (*Escherichia*  
467 *coli* e *Salmonella enterica*) têm a capacidade de controlar o pH intracelular, quando o  
468 pH extracelular torna-se altamente ácido, impedindo a entrada de íons de H<sup>+</sup> para o  
469 interior do citoplasma. Isso está atribuído ao gene ATR (gene de resposta de tolerância  
470 ao ácido), que protege a bactéria contra a ação do ácido (Foster, 1999; Merrell e  
471 Camilli, 2002; Álvarez-Ordóñez et al., 2012).

472 A suplementação com ácidos orgânicos em dietas para frangos de corte  
473 apresenta resultados positivos (Viola e Vieira, 2007), melhorando o desempenho  
474 zootécnico, principalmente pela diminuição na contaminação intestinal por *Salmonella*  
475 spp., *Campylobacter* e *Escherichia coli* (Van Immerseel et al., 2004; Chaveerach et al.,  
476 2004). O controle de patógenos intestinais reduz os danos causados aos tecidos  
477 epiteliais, como a redução na espessura da mucosa, mantendo a integridade dos vilos  
478 intestinais e melhorando os processos de digestão e absorção no intestino (Gunal et al.,  
479 2006).

480 Particularmente em aves, as bactérias patogênicas (*Salmonella* spp.) atingem o  
481 trato digestório após passarem pelo papo (inglúvio), onde existe um ambiente com pH  
482 baixo, atuando como importante barreira para impedir ou diminuir a colonização de  
483 patógenos (Freschi, 2014). Com as mudanças químicas e microbiológicas que ocorrem  
484 neste compartimento, há aumento da população de bactérias lácticas (*Lactobacillus*),  
485 capazes de reduzir o crescimento de Enterobactérias no papo, por exclusão  
486 competitiva, diminuindo a capacidade de aderência das bactérias com fímbrias às  
487 paredes do trato intestinal (Hume et al., 1993; Hinton et al., 2000; Hume, 2011),  
488 beneficiando a mucosa intestinal das aves (Viola e Vieira, 2007).

489 A redução do pH gástrico diminui o trânsito gastrintestinal, aumentando o tempo  
490 de retenção dos alimentos e potencializando a atividade de enzimas proteolíticas  
491 (Costa et al., 2013). Este efeito é decorrente da liberação de íons H<sup>+</sup>, reduzindo o pH do  
492 estômago, estimulando a conversão de pepsinogênio (inativo) em pepsina (forma ativa),  
493 melhorando a digestão de proteínas, além de inibir o crescimento bacteriano por efeito  
494 bactericida (Mroz, 2005; Kil et al., 2006). Além disso, os ácidos orgânicos estimulam a  
495 secreção exócrina de enzimas pancreáticas e bicarbonato, contribuindo para a digestão  
496 de aminoácidos e lipídios no intestino (Lückstädt e Mellor, 2011; Suryanarayana et al.,  
497 2012).

498

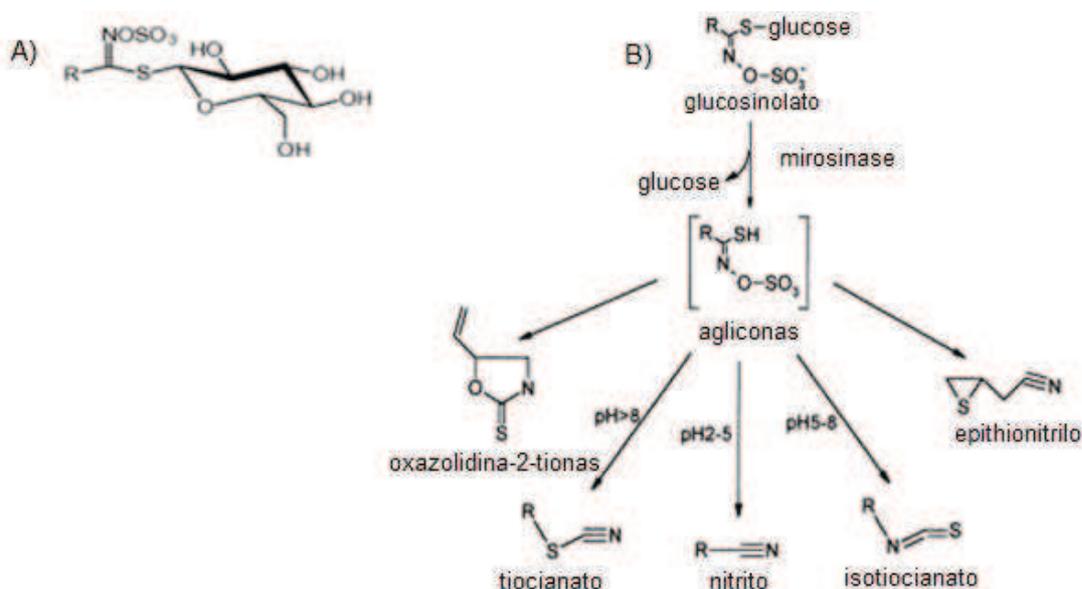
## 499 **2.5.2 Formação e ocorrência de isotiocianato de alila na mostarda**

500

501 As mostardas são plantas crucíferas, da família Brassicaceae, assim como  
502 repolho, brócolis e outras espécies. Os glucosinolatos são os principais metabólitos

503 secundários encontrados em plantas crucíferas, os quais são convertidos em  
 504 isotiocianatos, principal componente do óleo essencial da mostarda (Daxenbichler et al.,  
 505 1991; Hanschen et al., 2012; Marton e Lavric, 2013). Os glucosinolatos parecem estar  
 506 presentes em todas as partes das plantas (raiz, caule, sementes e folhas) das espécies  
 507 crucíferas (Figura 3), e são bem conhecidos pela sua importante participação na  
 508 proteção e resistência das plantas contra insetos e organismos patógenos (Sønderby et  
 509 al., 2010).

510



511  
 512 Figura 3: A) Estrutura dos glucosinolatos, cadeia lateral “R” derivada a partir de aminoácidos. B)  
 513 Catalisação das moléculas de agliconas pela enzima mirosinase, enquanto os produtos finais  
 514 são formados não enzimaticamente ou através de uma proteína (Adaptado de Chen e  
 515 Andreasson 2001; Mithen et al., 2010).

516  
 517 Em todas as plantas do gênero *Brassica* há presença de glucosinolatos  
 518 localizados em vacúolos e da isoenzima mirosinase (tioglucosideo glucohidrolase, EC  
 519 3.2.3.147) localizada no citoplasma, encontrados dentro dos tecidos vegetais intactos,  
 520 (Yabar et al., 2011; Ghawi et al., 2013). Quando ocorrem danos às estruturas dos  
 521 tecidos (mastigação, corte, maceração), os glucosinolatos são liberados e entram em  
 522 contato a enzima mirosinase. Na presença de água, ocorre a clivação das ligações tio-  
 523 glicose dos glucosinolatos produzindo glucose e agliconas (thiohydroxamate-O-

524 sulfonato), compostos altamente instáveis, que dependendo das condições de pH e  
525 disponibilidade de íons ferrosos da reação, formam vários produtos de degradação  
526 bioativos, através de uma via conhecida como “via rearranjo de Lossen”, formando  
527 isotiocianatos, tiocianatos, nitrilos, epitionitrilos ou oxazolidina-2-tionas, os  
528 glucosinolatos que dão origem ao isotiocianato de alila são conhecido também como  
529 sinigrina e encontrado principalmente na mostarda marrom. (Bones e Rossiter, 1996;  
530 Halkier e Du, 1997; Luciano 2010; Marton e Lavric, 2013).

531 Aproximadamente 120 glucosinolatos foram identificados e partilham uma  
532 estrutura química que consiste de um resíduo de  $\beta$ -glucopiranosose, ligado através de um  
533 átomo de enxofre, grupos hidroxílicos ou carbônicos, além de um grupamento “R”  
534 variável, ligado por um grupo metileno (Fahey et al., 2001; Halkier e Gershenzon 2006;  
535 Agerbirk e Olsen 2012). Os glucosinolatos conhecidos comumente pelos nomes de  
536 sinigrina (2-propenilo ou alilo glucosinolatos) e sinalbin (glucosinato 4-hidroxibenzil),  
537 identificados na semente de três espécies de mostarda, em maior quantidade na  
538 marrom (*Brassica juncea*), preta (*Brassica nigra*) e a branca (*Sinapis alba*),  
539 respectivamente (Fahey et al., 2001).

540 De maneira geral, os isotiocianatos são caracterizados pela presença das  
541 ligações entre grupos de  $-N=C=S$ , em que o átomo de carbono central é altamente  
542 eletrofílico, sendo atribuído a isto o seu potencial biológico (Marton e Lavric, 2013). O  
543 sistema de glucosinolatos-mirosinase é descrito como um sistema de defesa química  
544 ativada após danos no tecido de plantas especializadas e, ainda há indícios de que  
545 pode ocorrer hidrólise dos glucosinolatos no trato gastrointestinal sob a ação de alguns  
546 micro-organismos (Halkier e Gershenzon, 2006), atuando contra um amplo espectro de  
547 agentes potencialmente patogênicos.

548 Os glucosinolatos, relatados como principais precursores dos  
549 componentes do óleo da mostarda têm sido utilizados por milhares de anos pelos  
550 humanos (Kalemba e Kunicka, 2003). Os óleos essenciais extraídos da mostarda têm  
551 potencial antimicrobiano, quando testados em alimentos (Burt, 2004). Zhang (2004)  
552 relatou que o isotiocianato de alila é um dos antimicrobianos de origem vegetal mais  
553 potente, justificando assim o uso desses produtos naturais contra o crescimento de

554 bactérias patogênicas presentes em matérias-primas ou substratos que compõem a  
555 ração animal.

556

### 557 **2.5.3 Isotiocianato de alila: Mecanismo de ação**

558

559 A ausência de segurança alimentar coloca em risco a saúde pública e é motivo  
560 de grande preocupação para os consumidores, agências reguladoras e indústrias de  
561 alimentos em todo o mundo (Borges et al., 2014). As iniciativas para o controle de  
562 doenças transmitidas por alimentos visam reduzir, inibir ou retardar o crescimento de  
563 micro-organismos sobre os produtos alimentares, utilizando compostos de origem  
564 natural (Jacob e Anwar, 2008; Jang et al., 2010).

565 Os isotiocianatos apresentam atividades biocidas contra uma vasta gama de  
566 patógenos bacterianos (Dufour et al., 2012; Wilson et al., 2013). Jang et al. (2010),  
567 observaram que o isotiocianato teve efeito antibacteriano contra inúmeras bactérias,  
568 tais como a *Salmonella enterica*, além de efeitos fungicidas (Vig et al., 2009).

569 Os mecanismos de ação pelo qual os isotiocianatos atuam sobre as bactérias  
570 (Turgis et al., 2009; Dufour et al., 2015), ocorrem devido à presença de um átomo de  
571 carbono e enxofre altamente reativos ( $-N=C=S$ ) em sua estrutura (Zhang, 2012; Dufour  
572 et al., 2015). O potencial eletrofílico do isotiocianato parece interagir com os  
573 componentes da superfície da membrana celular bacteriana, modificando suas  
574 propriedades físico-químicas, alterando a característica hidrofóbica da membrana e  
575 afetando a integridade da membrana citoplasmática das bactérias gram-positivas (Burt,  
576 2004). Este efeito também é observado em bactérias gram-negativas, alterando o  
577 caráter hidrofóbico da camada lipopolissacarídea (LPS), penetrando na membrana  
578 citoplasmática e provocando a inativação de enzimas, causando a morte das bactérias  
579 (Borges et al., 2014).

580 Para Carson et al. (2002), um indicativo dos danos irreversíveis provocados na  
581 membrana citoplasmática é a perda do material citoplasmático como  $K^+$ , comprovando  
582 a capacidade de reação com a membrana celular externa. A atividade antimicrobiana  
583 pode envolver também reações com os grupos tióis e glutathiona ou atividade redox das  
584 proteínas, com subsequente inibição das atividades das enzimas sulfídricas e inibição

585 das defesas baseadas no desequilíbrio redox intracelular (Kolm et al., 1995; Jacob e  
586 Anwar, 2008).

587 Os carbonos dos isotiocianatos são bastante eletrofílicos e reagem facilmente  
588 com nucleófilos, como tióis e aminas, e tais reações resultam em modificações das  
589 proteínas e processos bioquímicos (Jacob e Anwar, 2008). Os isotiocianatos atacam  
590 tióis aleatoriamente, bem como aminas, peptídeos, proteínas e enzimas, sendo que  
591 esse mecanismo de ação está relacionado com a reatividade com grupos sulfídricos  
592 (Dufour et al., 2015). Ao reagir com tióis (RSH), e derivados de cisteína (Cis) das  
593 proteínas, através de um mecanismo de troca pela glutathione transferase, podem  
594 formar dissulfetos mistos (RSSR'), provocando modificações de proteínas e enzimas,  
595 prejudicando o bom funcionamento das células e causando sua morte (Jacob et al.,  
596 2003), além disso, o isotiocianato de alila inibe a enzima acetato quinase responsável  
597 pelas reações metabólicas importantes em bactérias (Luciano e Holley, 2009).

598 As alterações desencadeiam diversos eventos prejudiciais, como a conversão de  
599 uma molécula de O<sub>2</sub> em um radical superóxido de oxigênio, ponto de partida para  
600 formar vários tipos de oxigênios reativos. O O<sub>2</sub> é convertido em H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pela superóxido  
601 dismutase (SOD), enzima específica presente em micro-organismos, alterando a  
602 proliferação celular. Entre muitas reações possíveis, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> pode ser reduzido por  
603 transferência de um elétron para um radical hidroxila (HO), na presença de ferro e íons  
604 de cobre se tornando altamente reativo para qualquer biomolécula à base de carbono.  
605 Este composto oxida DNA, RNA, proteínas, lipídios e enzimas, resultando em morte  
606 celular (Dufour et al., 2013 e 2015).

607 Os Isotiocianatos podem inibir sítios de ligação de ATP e de P-ATPase em  
608 bactérias como *Escherichia coli* (Breier e Ziegelhoffer, 2000). As alterações causadas  
609 através das modificações dos resíduos de cisteína e das proteínas relacionadas com a  
610 síntese de ATP, reduzem o consumo de oxigênio e o teor de ATP intracelular, o que  
611 sugere mudança no equilíbrio do metabolismo energético (Dufour et al., 2013). Este  
612 efeito pode contribuir para a ação antimicrobiana do ITA em células bacterianas,  
613 perturbando a homeostase e o equilíbrio redox das células (Dufour et al., 2012).  
614 Portanto, a eficácia do ITA pode ser dependente tanto da taxa de degradação

615 espontânea de ITA com tiol, como dos mecanismos dos processos específicos isolados  
616 (Dufour et al., 2012).

617

#### 618 **2.5.4 Formação e ocorrência de carvacrol no orégano**

619

620 O orégano pertence à família Lamiaceae (*Labiatae*), da qual também fazem parte  
621 o manjeriço (*Ocimum basilicul* L.), o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) e a sálvia  
622 (*Salvia officinalis* L.) (Fonseca, 2012). Os óleos essenciais são chamados de óleos  
623 voláteis ou ésteres, sendo considerados como metabólitos secundários. O carvacrol,  
624 metabólito secundário do orégano, é um composto volátil (fenilpropenos e terpenos),  
625 caracterizados por uma atividade sensorial forte (Picone et al., 2013), de baixo ponto de  
626 ebulição, associados a plantas aromáticas, conhecidas como "ervas e especiarias"  
627 (Brenes e Roura, 2010).

628 Dentre os metabólitos, os terpenóides são encontrados com maior frequência e  
629 compreendem todas as substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do  
630 isopreno (2-metil-1,3-butadieno) e são sintetizadas pela via do mevalonato (Pereira e  
631 Cardoso, 2012). Não há genes ou enzimas responsáveis pela formação do carvacrol,  
632 existe apenas para formação de  $\gamma$ -terpineno, precursor de monoterpeno, que irá compor  
633 o óleo essencial, produzido em tricomas glandulares, situadas nas partes aéreas das  
634 plantas (Grades, 2011).

635 A formação do carvacrol ocorre através dos produtos da biossíntese de  
636 terpenóides, como substrato de monoterpenos e sesquiterpenos, que são  
637 provavelmente derivados da hidroxilação de um dos produtos cíclicos iniciais de  $\gamma$ -  
638 terpineno. Em estudos recentes com dois cultivares de orégano (*Origanum vulgare*) foi  
639 demonstrado que o  $\gamma$ -terpinene é formado a partir de geranyl difosfato (GPP) por  
640 monoterpenos-sintetases (Crocoll et al., 2010). A ocorrência de  $\gamma$ -terpineno é um  
641 mecanismo comum de biossíntese de carvacrol. Os monoterpeno-sintases são  
642 responsáveis por produzirem a maior parte dos componentes de terpenos do óleo  
643 essencial do *Origanum vulgare*, pela conversão do geranyl difosfato (GPP) em  
644 intermediários cíclicos, formando um cátion de linalilo, dando origem ao  $\alpha$ -terpinilo,  
645 precursor central para formar  $\gamma$ -terpineno. Nestas reações, os esqueletos de carbonos

646 lineares de GPP e difosfato de farnesilo (FPP) são reagrupados formando esqueletos  
647 de base de terpeno por terpeno-sintases (Lee et al., 2004; Grades, 2011).

648 A biossíntese de terpenos nas plantas ocorre pela via mevalonato (MVA),  
649 localizado no citosol, peroxissomas e no retículo endoplasmático (ER). Na via do  
650 mevalonato, os terpenos são formados a partir de compostos com cinco carbonos, onde  
651 o difosfato de dimetilalilo e o difosfato de isopentenilo serão unidos por  
652 preniltransferases para formar difosfato de geranilo (GPP, C10), precursor de  
653 monoterpenos (Grades, 2011; Tholl, 2006). Os monoterpenos oxidados de carvacrol  
654 são provavelmente derivados de um dos produtos iniciais cíclicos de  $\gamma$ -terpineno  
655 (Poulose e Croteau, 1978). A oxidação, redução, rearranjo (fechamentos de anéis  
656 adicionais), conjugação e isomerização de duplas ligações são resultados de uma  
657 grande diversidade de estruturas de monoterpenos (Grades, 2011).

658 A grande diversidade de terpenos é devido ao grande número de diferentes  
659 enzimas terpeno-sintases, produzindo múltiplos produtos responsáveis pela enorme  
660 diversidade estrutural de mono e sesquiterpenos. A estreita relação de  $\gamma$ -terpinene com  
661 a composição dos terpenos indica que a regulação e transcrição de genes para a  
662 síntese de terpenos é o mais importante mecanismo regulador de controle e  
663 composição de terpenos em *Origanum vulgare* (Tholl, 2006; Degenhardt et al, 2009;  
664 Crocoll et al., 2010).

665

### 666 **2.5.5 Carvacrol: Mecanismo de ação**

667

668 Os alimentos são naturalmente contaminados e devem ser submetidos a  
669 tratamentos tornando-os microbiologicamente estáveis. Diante disso, o uso de  
670 conservantes naturais é uma abordagem adequada para evitar a proliferação de  
671 bactérias (Belda-Galbis et al., 2014), devido aos seus efeitos antimicrobianos. O  
672 carvacrol reage diretamente com a membrana celular bacteriana rompendo as ligações  
673 lipídicas (Carson et al., 2002; Ceylan e Fung, 2004; Holley e Patell, 2005; Bakkali et al.,  
674 2008), nas partes hidrofóbicas da membrana, atravessando a parede celular e a  
675 membrana citoplasmática e afetando a estrutura das diferentes camadas de  
676 lipopolissacarídeo (LPS) dos fosfolipídios, rompendo as ligações lipídicas e

677 aumentando sua permeabilidade (Holley e Patel, 2005; Brenes e Roura, 2010). Os  
678 danos causados à membrana citoplasmática dos micro-organismos alteram a  
679 permeabilidade da membrana citoplasmática. Este efeito interfere na replicação  
680 cromossômica e na síntese proteica celular (Fei et al., 2011; Ceylan e Fung, 2004; Dias,  
681 2011).

682         Esse mecanismo de ação pode ocorrer no exterior das duas membranas  
683 celulares das bactérias gram-negativas, desintegrando-as após exposição aos óleos  
684 essenciais (Helander et al., 1998), alterando a fluidez das membranas, resultando em  
685 perdas de radicais, citocromo C, íons de cálcio e proteínas, causando stress oxidativo e  
686 insuficiência bioenergética. Esta reação em cadeia acontece quando os compostos se  
687 difundem por toda a célula, desestruturando as membranas de diferentes organelas,  
688 tais como as mitocôndrias e os peroxissomas (Bakkali et al., 2008). Esta atividade se  
689 deve à presença de constituintes bioativos (terpenos e terpenóides), capazes de causar  
690 lesões e danos às células microbianas, levando à redução do crescimento ou morte  
691 celular (Picone et al., 2013). A alteração da concentração de Na<sup>+</sup> e K<sup>+</sup> e íons de H<sup>+</sup> leva  
692 ao comprometimento de processos essenciais para sobrevivência celular, como a  
693 ativação de enzimas citoplasmáticas, síntese proteica de DNA e RNA, manutenção da  
694 pressão osmótica, levando ao aumento de turgor e, certamente, a morte bacteriana  
695 (Sikkema et al., 1995; Ultee et al., 1999, 2000; Bakkali et al., 2008).

696         De maneira geral, o carvacrol se difunde através da membrana citoplasmática e  
697 dissocia-se no interior do citoplasma, liberando seu próton para o citoplasma. Em  
698 seguida, liga-se a um íon de potássio (ou qualquer outro cátion) a partir do citoplasma,  
699 que é transportado através da membrana citoplasmática ao exterior da célula. Dessa  
700 forma, o carvacrol na forma protonada difunde-se novamente através da membrana  
701 citoplasmática e dissocia-se novamente por liberação de um próton para o citoplasma  
702 (Ultee et al., 2002). Esse efeito pode ser observado em bactérias gram-negativas e  
703 gram-positivas, podendo variar pelo tempo de exposição e concentração utilizada  
704 (Inamuco et al., 2012).

705

## 706 **2.5.6 Antimicrobianos naturais na dieta de frangos**

707

708 Os animais de produção infectados por agentes patogênicos entéricos são  
709 muitas vezes identificados como fontes primárias de doenças de origem alimentar aos  
710 seres humanos, causando vários problemas de saúde pública (Silva et al., 2010). Para  
711 controlar a presença de patógenos na produção animal, muitos países têm buscado por  
712 melhoradores de desempenho de origem natural que garanta o desempenho e a saúde  
713 animal (Tiihonen et al., 2010). Nesta classe, encontram-se os aditivos derivados de  
714 plantas e animais, com potencial para serem utilizados na alimentação animal para  
715 inibir o crescimento de patógenos melhorando a saúde intestinal, atuarem diretamente  
716 no metabolismo animal e promoverem maior crescimento (Windisch et al., 2008). Os  
717 diferentes mecanismos de ação dos OEs e dos ácidos orgânicos estão relacionados  
718 com seus efeitos sensoriais, metabólicos, antioxidantes e antimicrobianos (Maiorka et  
719 al., 2004; Brenes e Roura, 2010).

720 Uma das formas de uso na alimentação animal é a aplicação de óleos essenciais  
721 e ácidos orgânicos na ração, para inibir o crescimento de bactérias e melhorar as  
722 condições intestinais do animal após a ingestão da ração. Bona et al. (2012)  
723 observaram que o uso de 100 ppm de uma mistura de óleos essenciais (orégano,  
724 alecrim, canela e extrato de pimenta) na alimentação de frangos reduziu lesões  
725 específicas causadas no intestino por *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium*, além de  
726 reduzir as contagens destas bactérias no conteúdo do ceco das aves. Johny et al.  
727 (2010) observaram que as culturas de *Salmonella* Enteritidis e *Campylobacter jejuni*  
728 resistentes a antibióticos, coletadas do trato intestinal de frangos, reduziram  
729 rapidamente quando expostas a 50 ppm de carvacrol e 75 ppm de eugenol *in vitro*.  
730 Maiorka et al. (2004) observaram que a mistura de 0,05% de ácidos orgânicos  
731 (fumárico, láctico, cítrico e ascórbico) adicionados à ração melhoraram o desempenho de  
732 frangos corte com efeito antibacteriano principalmente contra *Escherichia coli*,  
733 *Salmonella* e *Campylobacter* (Ricke, 2003).

734 Outros efeitos são observados no trato gastrintestinal dos animais com o uso de  
735 compostos naturais (óleos essenciais e ácidos orgânicos), como a melhora na  
736 conversão alimentar (Alçiçek et al., 2003; Maiorka et al., 2004), melhora da morfologia  
737 intestinal e do desempenho de frangos de corte (Windisch et al., 2008; Johny et al.,  
738 2010). Em estudo realizado por Ertas et al. (2005), utilizando 200 ppm de uma mistura

739 de óleos essenciais na dieta de frangos de corte, foi observado aumento no ganho  
740 diário de peso e melhora na conversão alimentar, em relação ao grupo controle e ao  
741 grupo que recebeu antibióticos. Sterzo et al. (2007) observaram que os ácidos  
742 orgânicos são capazes de prevenir e inibir a colonização por *Salmonella* Enteritidis no  
743 intestino das aves. OEs, assim como os ácidos orgânicos, têm mostrado resultados  
744 promissores em inibir várias infecções intestinais em diversos modelos experimentais  
745 (Maiorka et al., 2004; Tiihonen et al., 2010). Isso sugere que estes aditivos têm elevado  
746 potencial para substituírem os antibióticos melhoradores de desempenho para frangos  
747 de corte.

748

## 749 **2.6 Utilização de modelos laboratoriais para simulação de digestão**

750

751 A digestão simulada começou a ser utilizada durante a década de 60, onde  
752 investigava-se a importância das fibras indigeríveis na dieta para humanos. A técnica  
753 de fermentação *in vitro* surgiu como alternativa para reproduzir os processos  
754 fisiológicos, no entanto, os primeiros métodos aceitos para determinar e caracterizar as  
755 fibras indigeríveis presentes na dieta foram desenvolvidos por Van Soest (1966). As  
756 técnicas aprimoradas e utilizadas a partir deste período eram capazes de simular a  
757 digestão humana através da utilização de um processo *in vitro*, utilizando enzimas de  
758 mamíferos, em um procedimento que melhor reproduzia as características fisiológicas  
759 do trato digestório do homem (Honig e Rackis, 1979), avaliando a digestibilidade de  
760 carboidratos não digeríveis (Englyst et al. 1982).

761 Nos últimos anos tem havido grande interesse em estudos com disponibilidade  
762 de alimentos e nutrientes protegidos ou encapsulados e com culturas de micro-  
763 organismos (probióticos) que melhorem as condições do trato digestório. Com isso,  
764 modelos de digestão *in vitro* estão sendo amplamente utilizados para verificar a  
765 digestibilidade (Malathi e Devegowda, 2001; Fengying et al., 2011), liberação dos  
766 componentes (Marambe et al., 2011) e biodisponibilidade (Versantvoort et al., 2005)  
767 dos alimentos em condições gastrintestinais simuladas. No entanto, os resultados  
768 obtidos com modelos de digestão *in vitro* ainda são diferentes dos encontrados  
769 em modelos *in vivo*, pela dificuldade em reproduzir com precisão as condições físico-

770 químicas altamente complexas e eventos fisiológicos que ocorrem no aparelho  
771 digestório de animais (Martinez-Haro et al., 2009; Hur et al., 2011).

772 A utilização de animais fornece resultados mais precisos, no entanto, a obtenção  
773 dos resultados são demorados e de custo elevado (Giuberti et al., 2012). Por isso, o  
774 uso de um modelo laboratorial para verificar o efeito antimicrobiano de compostos de  
775 origem natural, durante o processo de digestão animal, nas mesmas condições  
776 gastrintestinais (Michiels et al., 2007), pode fornecer dados mais rápidos além de ser  
777 alternativa ao uso de animais (Avantaggiato et al., 2003).

778 Os estudos realizados até o presente momento, simulando o trato gastrintestinal  
779 de frangos de corte, estão voltados apenas à determinação da digestibilidade e  
780 disponibilidade de nutrientes (Weurding et al. 2001). Walk et al. (2015) avaliaram a  
781 interação e disponibilidade de Ca e P, adicionando fitase na ração, simulando as  
782 condições gastrintestinais (temperatura, pH e secreção de enzimas) de frangos de  
783 corte. Weurding et al. (2001), por sua vez, utilizaram o método *in vitro* para determinar a  
784 digestibilidade do amido no proventrículo e na moela.

785 Outro estudo realizado por Wali e Beal (2011), simulando o trato digestório  
786 (papo, proventrículo, moela e intestino delgado) de frangos de corte, demonstrou que,  
787 além de sobreviver às condições intestinais, as populações de *Lactobacillus salivarius*  
788 inibiram o crescimento de *Salmonella* Typhimurium. Chang e Chen (2000) simularam o  
789 aparelho digestório de frangos (papo, proventrículo, moela, intestino delgado e grosso)  
790 para investigar o impacto de uma cultura mista de *Lactobacillus* sobre a colonização  
791 intestinal por *Campylobacter jejuni*, e observaram que após todo processo de  
792 simulação, não foi detectada a presença *C. jejuni* no intestino grosso. Esses autores  
793 sugerem que bactérias lácticas podem inibir o crescimento de micro-organismos  
794 indesejáveis no trato gastrintestinal, contribuindo para o crescimento de micro-  
795 organismos benéficos na produção de frangos.

796 Apesar do potencial antimicrobiano dos óleos essenciais e dos ácidos orgânicos  
797 serem comprovados (Chacon et al., 2006; Pickler et al., 2012), ainda não é possível  
798 afirmar que estes são eficazes contra *Salmonella* ou qualquer outro micro-organismo  
799 durante a simulação da digestão, devido à baixa solubilidade em água e elevada  
800 volatilidade dos óleos essenciais. Além disso, não existem informações na literatura

801 sobre o efeito antimicrobiano contra bactérias patogênicas e não patogênicas em um  
802 processo de digestão in vitro de frangos de corte.

803 Os usos de compostos naturais melhoram a conversão alimentar e a morfologia  
804 da mucosa intestinal garantindo bons índices de desempenho de frangos de corte  
805 (Alçiçek et al., 2003; Maiorka et al., 2004; Ertas et al. 2005; Michiels et al., 2007;  
806 Windisch et al., 2008; Johnny et al., 2010). Estes compostos podem inibir a colonização  
807 por *Salmonella* Enteritidis no intestino de frangos de corte, prevenindo contra várias  
808 infecções intestinais em diversos modelos experimentais (Maiorka et al., 2004; Sterzo et  
809 al., 2007; Tiihonen et al., 2010). Portanto, esses compostos devem ser testados nas  
810 mesmas condições gastrintestinais dos animais, avaliando seus efeitos contra  
811 populações microbianas mistas, para compreender plenamente o seu potencial  
812 antimicrobiano como uma alternativa aos melhoradores de desempenho convencionais  
813 (Michiels et al., 2007).

814

815 **CAPÍTULO 3**

816

817 **ANTIMICROBIANOS NATURAIS PARA CONTROLE DE *SALMONELLA***  
818 **ENTERITIDIS NA RAÇÃO E NO TRATO DIGESTÓRIO SIMULADO DE**  
819 **FRANGOS DE CORTE**

820

821 *Natural antimicrobial in control of Salmonella Enteritidis in feed and trough simulated*

822

*digestion of broilers*

823

824 **RESUMO**

825 O presente trabalho foi conduzido com o objetivo de avaliar o efeito antimicrobiano *in*  
826 *vitro* de óleos essenciais (OE) e ácidos orgânicos (AO), isolados ou em combinação,  
827 sobre a população de *Salmonella* Enteritidis na ração e no trato digestório simulado de  
828 frangos de corte. Para os OE, foram testadas doses de 12,5 a 800 ppm de isotiocianato  
829 de alila (ITA) e doses de 50 a 800 ppm de carvacrol (CV). Para os AO, foram utilizadas  
830 doses de 37 a 297 ppm de ácido propiônico (PROP) e doses de 23 a 930 ppm de ácido  
831 caproico (CAP). As diferentes doses dos antimicrobianos foram adicionadas em caldo  
832 TSB, em pH 6,0, e avaliadas frente a um *pool* de 5 cepas de *Salmonella* Enteritidis,  
833 incubado a 37°C/24h. A partir dos valores de concentração inibitória mínima (CIM) dos  
834 compostos isolados, foram testadas combinações de OE + AO com doses reduzidas  
835 em 1/2, 1/4 e 1/8 da CIM para avaliar o efeito combinado dos aditivos. Os  
836 antimicrobianos selecionados foram adicionados em uma ração comercial para frangos  
837 de corte na fase inicial para avaliar seus efeitos contra *Salmonella* Enteritidis. Para esta  
838 etapa, as concentrações de antimicrobianos utilizadas foram: T1 – controle (inoculado  
839 de *Salmonella* Enteritidis); T2 - 62,5 ppm de ITA + 175 ppm de CAP; T3 - 125 ppm de  
840 ITA + 350 ppm de CAP; T4 - 187,5 ppm de ITA + 525 ppm de CAP. As contagens de  
841 *Salmonella* foram realizadas a cada dois dias, durante 8 dias. Em seguida, o tratamento  
842 com melhor efeito contra *Salmonella* foi selecionado para a simulação da digestão (*in*  
843 *vitro*) de frangos, frente ao *pool* de *Salmonella* Enteritidis e *Lactobacillus plantarum*.  
844 Para isso, foi utilizada ração comercial de frangos de corte, na fase inicial, sem adição  
845 de antibióticos e com a inclusão de ITA e CAP nas concentrações de 187,5 ppm e 525  
846 ppm. A ração com os antimicrobianos foi submetida ao processo de digestão *in vitro*  
847 pelo tempo total de 4h20min. Foram avaliados os compartimentos que simulavam as  
848 condições enzimáticas, de pH, temperatura e agitação do papo, proventrículo, moela,  
849 intestino delgado e intestino grosso. Entre os OEs, a menor CIM foi obtida para o ITA  
850 (25 ppm) enquanto que a CIM do CV foi de 150 ppm; e entre os AOs, o CAP  
851 apresentou efeito inibitório em menor dose (70 ppm), enquanto a CIM do PROP foi de  
852 75 ppm. Nos testes de sinergia, a menor concentração combinada que apresentou  
853 efeito sinérgico foi a de 6,25 ppm de ITA e 17,5 ppm de CAP. Na ração, o T4 reduziu a  
854 presença de *Salmonella* Enteritidis de 2.63 ± 0,21 log para níveis indetectáveis (<1,25  
855 log) após 8 dias (P<0,05). No processo de digestão *in vitro*, foi observada diferenças  
856 (P<0,05) nas contagens de *Salmonella* Enteritidis. No entanto, a população de  
857 *Lactobacillus plantarum* não sofreu alteração. A combinação de 187,5 ppm de ITA e

858 525 ppm de CAP foi eficiente contra *Salmonella* Enteritidis em ração e após o processo  
859 de digestão *in vitro*, não afetando a contagem de *Lactobacillus plantarum* no intestino  
860 delgado.

861  
862 **Palavras-chave:** Antimicrobianos naturais, frangos, digestão simulada, efeito sinérgico,  
863 e sistema digestório.

864

## 865 **ABSTRACT**

866 This *in vitro* study was carried out to evaluate the antimicrobial effect of essential oils  
867 (EO) and organic acids (OA), alone or combined, against *Salmonella* Enteritidis and  
868 *Lactobacillus plantarum*. The tested doses of allyl isothiocyanate (AITC) were 12.5 to  
869 800 ppm, while 50 to 800 ppm were tested to carvacrol (CV). Further, propionic and  
870 caproic acids (CAP) were tested using doses of 37 to 297 ppm and 23 to 930 ppm,  
871 respectively. The different doses of these antimicrobial agents were added in TSB broth,  
872 pH 6.0, and evaluated against five strains of *Salmonella* Enteritidis, incubated at  
873 37°C/24h, to find the minimal inhibitory concentration (MIC). After finding the MICs from  
874 these isolated compounds, the association of EO + OA in concentrations of 1/2, 1/4, and  
875 1/8 from the MIC was tested to investigate if there is a synergic antimicrobial effect. The  
876 tested antimicrobials were included in a commercial feed for broiler chickens to assess  
877 its effects on growth of *Salmonella* Enteritidis. For this step, the antimicrobial  
878 concentrations used were T1 - control (only inoculated with *S. Enteritidis*); T2 - 62.5 ppm  
879 of AITC + 175 ppm of CAP; T3 - 125 ppm of AITC + 350 ppm of CAP; T4 - 187.5 ppm of  
880 AITC + 525 ppm of CAP. Afterwards, *Salmonella* counts were performed on 0, 2, 4, 6,  
881 and 8 days to assess the antibacterial effect of the AITC + CAP. Then treatment with a  
882 better antibacterial effect against *Salmonella* was selected to simulate the *in vitro*  
883 digestion of chickens, against the pool of *Salmonella* Enteritidis and *Lactobacillus*  
884 *plantarum*. For this, a commercial feed was used for broiler chickens in the initial stage  
885 of life, without antibiotics, with inclusion of AITC and CAP at concentrations of 525 ppm  
886 and 187.5 ppm, respectively, and a control treatment without antimicrobials. The feed  
887 with antimicrobials was submitted to *in vitro* digestion by 4h20min. The *in vitro* digestive  
888 process was mimicked in the crop, proventriculus, gizzard, small intestine and large  
889 intestine compartments of broilers, in enzymatic conditions, pH, temperature and  
890 agitation specific for this species. Among the EO, the lowest MIC was obtained for AITC  
891 (25 ppm), the MIC CV was 150 ppm; and among the OA, the CAP showed inhibitory  
892 effect in the smaller dose (70 ppm), the MIC PROP was 75 ppm. The association of 6.25  
893 ppm of AITC and 17.5 mM of CAP was the lowest dose capable of presenting  
894 synergistic effect. In the feed, the T4 reduced from  $2.63 \pm 0,21$  log to undetectable levels  
895 ( $<1.25$  log) the presence *Salmonella* Enteritidis on 0 to 8 days. After the *in vitro*  
896 digestion, T4 also decreased ( $P<0.05$ ) accounts of *Salmonella* Enteritidis. The  
897 *Lactobacillus plantarum* cultures collected from the digesta were not altered. The  
898 combination of 187.5 ppm of AITC and 525 ppm CAP was effective against *Salmonella*  
899 Enteritidis strains in the feed, and afterwards, *in vitro* digestion, however, did not affect  
900 the *Lactobacillus plantarum* colonies in the mimicked small intestine.

901 **Keywords:** Natural antimicrobial, broilers, simulated digestion, synergistic effect and  
902 digestive system.

### 903 3.1 INTRODUÇÃO

904  
905 A produtividade na avicultura tem se destacado nos últimos anos, e este avanço  
906 é observado principalmente na produção de frangos de corte. O Brasil é considerado,  
907 atualmente, o segundo maior produtor e o maior exportador de carne de frango do  
908 mundo. Em 2015, as exportações brasileiras de carne frango apresentaram aumento de  
909 15,2% em relação ao ano anterior, totalizando 3,9 milhões de toneladas, que  
910 representaram 6,5 bilhões de dólares (ABPA, 2015).

911 Com a intensificação da produção de frangos, o controle sanitário tornou-se um  
912 procedimento prioritário nas granjas (Kottwitz et al., 2012; Pandini et al., 2014). Entre os  
913 patógenos mais veiculados pelos produtos avícolas está a bactéria *Salmonella*  
914 Enteritidis, causadora de doenças entéricas de origem alimentar em humanos e capaz  
915 de provocar perdas na produtividade animal (Mead et al., 2010; Olaimat e Holley, 2013).  
916 Anualmente, são documentados pela *European Food Safety Authority* (EFSA, 2015)  
917 mais de 100.000 casos de doenças entéricas, sendo a *Salmonella* Enteritidis  
918 responsável por 39,5% dos casos. De acordo com os dados do *Center for Disease*  
919 *Control and Prevention* (CDC), cerca de 1 milhão de casos de salmonelose ocorre a  
920 cada ano nos Estados Unidos da América (Scallan et al., 2011) e entre 200 milhões a  
921 1,3 bilhão de casos em todo o mundo (Coburn et al., 2007). *S. Enteritidis* representa  
922 85% dos casos de salmonelose na Europa, 38% na Ásia e 31% na América Latina e no  
923 Caribe (Cardoso, 2013).

924 As espécies de *Lactobacillus* são colonizadoras autóctones do trato  
925 gastrointestinal de frangos de corte, estando presentes desde a primeira semana de vida  
926 (Hilmi et al., 2007) das aves, melhorando a saúde intestinal, o desempenho e  
927 prevenindo de doenças (Stephenson et al., 2010). *Lactobacillus* são bactérias  
928 produtoras de ácido láctico, muito utilizadas como probióticos para humanos e animais,  
929 atuando no controle de enteropatogênicas (Willi e Beal, 2012).

930 Devido ao risco de desenvolvimento de micro-organismos multirresistentes a  
931 antibióticos, a Comissão Europeia (CE) decidiu eliminar progressivamente e, proibir em  
932 1º de janeiro de 2006, a comercialização e a utilização de antibióticos como  
933 melhoradores de desempenho na produção animal (Huyghebaert et al., 2011). Desde

934 então, o interesse por antimicrobianos de origem natural tem aumentado  
935 significativamente (Brenes e Roura, 2010). Neste sentido, o uso de ácidos orgânicos e  
936 óleos essenciais aparece como alternativas promissoras no controle e redução de  
937 micro-organismos patogênicos, especialmente quando adicionados em ração de aves e  
938 suínos (Van Immerseel et al., 2006; Shan et al., 2007; Windisch et al., 2008).

939 Os ácidos orgânicos (caproico e propiônico) estão amplamente distribuídos na  
940 natureza como componentes naturais de plantas e tecidos animais. Estes compostos  
941 são obtidos através da fermentação de hidratos de carbono, proteínas, gorduras e  
942 matéria orgânica no trato gastrointestinal dos animais e humanos, estritamente realizada  
943 pela microbiota anaeróbia predominante no intestino (Ricke, 2003; Zygmunt e Banel,  
944 2005; Costa et al., 2013). Os óleos essenciais isotiocianato de alila e carvacrol são  
945 produzidos por plantas da família Brassicaceae (Mostardas) e Lamiaceae (*Origanum*  
946 *vulgare*), respectivamente (Hanschen et al., 2012; Marton e Lavric, 2013). Eles são  
947 metabólitos secundários de misturas complexas de compostos voláteis (Picone et al.,  
948 2013), formados e degradados sob a ação de enzimas específicas, característicos  
949 destas espécies de plantas (Bakkali et al., 2008).

950 Os óleos essenciais e os ácidos orgânicos têm sido eficientes em inibir a  
951 proliferação de micro-organismos patógenos (Maiorka et al., 2004; Tiihonen et al.,  
952 2010). No entanto, se considerarmos a complexidade e o custo de ensaios *in vivo*  
953 (Giuberti et al., 2011), uma abordagem interessante para verificar os efeitos  
954 antimicrobianos dos compostos naturais no trato digestório de frangos de corte é a  
955 simulação da digestão *in vitro*, facilitando o estudo da microbiota do trato gastrointestinal,  
956 desempenhando um papel importante como um método de seleção rápida, para testar  
957 potenciais aditivos antimicrobianos alimentares antes de estudos *in vivo* (Avantaggiato  
958 et al., 2003), em condições gastrintestinais similares ao modelo *in vivo*, em diferentes  
959 compartimentos do trato digestório (Michiels et al., 2007). O presente trabalho teve  
960 como objetivo determinar a CIM dos óleos essenciais (OE), e ácidos orgânicos (AO),  
961 isolados e em combinação, contra *Salmonella* Enteritidis; avaliar o efeito antimicrobiano  
962 da combinação de OE e AO contra *S. Enteritidis* em ração de frango e avaliar o efeito  
963 da combinação de OE e AO contra *S. Enteritidis* e contra *Lactobacillus plantarum* em  
964 ração de frango durante digestão simulada *in vitro*.

## 965 **3.2 MATERIAL E MÉTODOS**

966

967 Todas as atividades foram desenvolvidas no Laboratório de Tecnologia de  
968 Produtos Agropecuários (LTPA) da Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
969 (PUCPR). Os antimicrobianos de origem natural utilizados foram os óleos essenciais  
970 carvacrol (Sigma-aldrich, Sant-louis, MO, EUA) e isotiocianato de alila (Sigma-aldrich,  
971 Sant-louis, MO), o ácido orgânico de cadeia curta, ácido propiônico (Vetec Química  
972 Fina Ltda. Duque de Caixias, RJ, Brasil), e o ácido orgânico de cadeia média, ácido  
973 caproico (Vetec Química Fina Ltda, Duque de Caixias, RJ, Brasil).

974 As cepas de *Salmonella* Enteritidis utilizadas foram: *S. Enteritidis* 9SUSP, *S.*  
975 *Enteritidis* 33SUSP, *S. Enteritidis* CRIFS1016 6FP, *S. Enteritidis* 56301 e *S. Enteritidis*  
976 *CRIFS*, da coleção de cultura do laboratório de TPA. As cepas de *Lactobacillus*  
977 *plantarum* utilizadas foram: *L. plantarum* 131, *L. plantarum* 192, *L. plantarum* 341 e *L.*  
978 *plantarum* 442 e *L. plantarum* 343 da coleção de cultura do laboratório de TPA.

979

### 980 **3.2.1 Experimento 1: Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)**

981

#### 982 **3.2.1.1 Preparação do inóculo**

983

984 O inóculo foi preparado pela ativação das cepas de *Salmonella* Enteritidis,  
985 individualmente, em 8 mL de caldo Triptona de Soja (TSB) (HiMedia Laboratórios,  
986 Mumbai, Índia) incubado em estufa (Modelo 502, Fanem, São Paulo-Brasil) por 24 h a  
987 37°C. Em seguida foi preparado um *pool* com 100µL de cada cepa em 9,5mL de caldo  
988 TSB, ativado pela incubação por 2 h a 37°C.

989

#### 990 **3.2.1.2 Preparação dos antimicrobianos de origem natural**

991

992 Para determinar as concentrações inibitórias mínimas dos óleos essenciais foi  
993 preparada uma solução mãe com 20 µL de óleo e 980 µL de dimetil sulfóxido (DMSO)  
994 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, USA) para melhor diluição dos óleos. Os ácidos foram  
995 adicionados diretamente no caldo de cultura, sem diluição em solução mãe.

996 A CIM dos óleos essenciais e dos ácidos orgânicos frente ao *pool* de *Salmonella*  
997 foi determinada pela técnica de diluição em tubos. Foram inoculados 80 µL do *pool* de  
998 *Salmonella* em caldo TSB com pH 6,0, que recebeu diferentes concentrações dos  
999 antimicrobianos. Para os OEs, foram testadas doses de 12,5 a 800 ppm de  
1000 isotiocianato de alila (ITA) e doses de 50 a 800 ppm de carvacrol (CV). Para os AO,  
1001 foram utilizadas doses de 37 a 297 ppm de ácido propiônico (PROP) e doses de 23 a  
1002 930 ppm de ácido caproico (CAP). Além disso foi preparado um teste sem a adição de  
1003 antimicrobianos. Os tubos foram incubados a 37°C por 24h. Todos os testes foram  
1004 realizados em triplicatas. A CIM foi definida como a menor concentração do  
1005 antimicrobiano onde não houve crescimento visível do micro-organismo (turvação).

### 1006

### 1007 **3.2.2 Experimento 2: Determinação do efeito combinado de óleos essenciais e**

### 1008 **ácidos orgânicos**

1009

1010 Foram testadas combinações óleo-óleo, ácido-ácido e óleo-ácido a partir das  
1011 CIM obtidas no ensaio anterior contra o *pool* de *Salmonella* Enteritidis. As cepas foram  
1012 preparadas utilizando o mesmo procedimento descrito no item 3.2.1.1. Para avaliação  
1013 do efeito combinado, as CIM (150 ppm de CV, 25 ppm de ITA, 70 ppm de CAP e 75  
1014 ppm de PROP) individuais dos antimicrobianos foram reduzidas em 1/2, 1/4 e 1/8. As  
1015 combinações (óleo-óleo, óleo-ácido e ácido-ácido) foram inoculadas em tubos contendo  
1016 caldo TSB com pH 6,0, previamente inoculado com 80 µL do *pool* de *Salmonella*  
1017 Enteritidis, incubados por 24 h a 37°C (Tabela 1).

1018

1019 Tabela 1 - Concentrações dos óleos essenciais carvacrol (CV) e isotiocianato de alila  
1020 (ITA) e dos ácidos orgânicos caproico (CAP) e propiônico (PROP) testados  
1021 em diferentes combinações

Concentrações combinadas			
CV ppm	ITA ppm	CAP ppm	PROP ppm
75,0	12,5	35,0	37,5
37,5	6,25	17,5	18,7
18,7	3,12	8,75	9,37

1022 Todos os testes foram feitos em triplicata, sendo avaliadas todas as combinações entre os  
1023 antimicrobianos a partir da CIM obtidas nos testes anteriores, totalizando 18 combinações.

1024  
1025 A CIM dos antimicrobianos combinados foi definida como a menor concentração  
1026 dos antimicrobianos onde não houve crescimento visível do micro-organismo  
1027 (turvação). Para verificar se houve efeito sinérgico entre os antimicrobianos testados,  
1028 utilizou-se a metodologia descrita por Palaniappan e Holley (2010), na qual foi calculado  
1029 o índice de concentração inibitória fracionada (FIC) pela seguinte equação:

- 1030 • Índice FIC =  $FIC^A + FIC^B$ , onde A representa o antimicrobiano 1 e B o  
1031 antimicrobiano 2. O FIC foi calculado da seguinte forma:
- 1032 •  $FIC^A$  do óleo = CIM do antimicrobiano 1 em combinação/CIM antimicrobiano 1  
1033 individualmente
- 1034 •  $FIC^B$  do ácido = CIM do antimicrobiano 2 em combinação/CIM antimicrobiano 2  
1035 individualmente

1036 As interações entre os antimicrobianos foram interpretadas da seguinte forma:

- 1037 • Efeito sinérgico: IFIC  $\leq 0,5$
- 1038 • Nenhuma interação: IFIC  $> 0,5$  ou  $< 4,0$
- 1039 • Efeito antagônico: IFIC  $\geq 4,0$

### 1040 **3.2.3 Experimento 3: Efeito dos antimicrobianos naturais adicionados à ração** 1041 **sobre *Salmonella* Enteritidis**

#### 1042 **3.2.3.1 Preparo das amostras**

1043  
1044 Para a realização desta etapa do experimento, foi utilizada ração comercial para  
1045 frangos de corte em fase inicial de crescimento, fornecida por uma empresa de Nutrição  
1046 Animal (Impextraco, Curitiba, PR, Brasil), sem a adição prévia de qualquer  
1047 antimicrobiano (Tabela 2).

1048 Para o estudo com a ração, foram selecionados apenas os compostos que  
1049 obtiveram melhor desempenho nos testes em combinação, sendo 6,25 ppm de  
1050 isotiocianato de alila e 17,5 ppm de ácido caproico.

1051

1052 Tabela 2 - Composição percentual e valores nutricionais calculados da ração para  
1053 frangos de corte na fase inicial

<b>Ingredientes</b>	<b>%</b>
Milho moído, 8%	57,32
Farelo de soja, 45%	36,31
Óleo Soja	2,382
Calcário Calcítico 35%	1,382
Fosfato Bicálcico	1,654
Sal	0,440
L-lisina	0,039
DL-metionina	0,235
L-Treonina	0,016
Premix mineral**	0,100
Premix vitamínico*	0,100
Antioxidante butilhidroxianisol (BHA)	0,015
<b>Valores calculados</b>	
Proteína bruta (%)	21,00
Energia metabolizável, kcal/kg	3.000
Fibra bruta, %	3,713
Cálcio disponível, %	0,950
Fósforo disponível, %	0,440
Sódio, %	0,200
Potássio, %	0,280
Cloro, %	0,276
Lisina, %	1,190
Metionina + cistina, %	0,910
Treonina, %	0,800
Colina, %	0,125
Lisina digestível, %	1,015
Metionina+cistina digestível, %	0,805
Treonina digestível, %	0,668

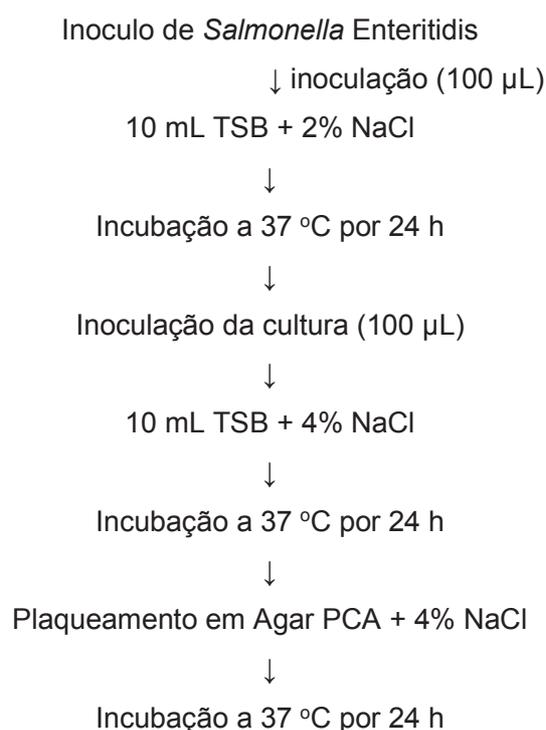
1054 \*Premix vitamínico para frangos de corte (por kg de produto). Vitamina A (mín) 10.000.000 UI/kg; Vitamina D3 (mín)  
1055 2.000.000 UI/kg; Vitamina E (mín) 30.000UI/kg; Vitamina K3 (mín) 2.000 mg/kg; Vitamina B1 (mín) 2.500mg/kg;  
1056 Vitamina B2 (mín) 6.000mg/kg; Vitamina B6 (mín) 3.000 mg/kg; Vitamina B12 (mín) 15.000mcg/kg; Pantoten.de  
1057 cálcio (mín) 12 g/kg; Niacina (mín) 40 g/kg; Biotina (mín) 100mg/kg; Ácido fólico (mín) 1.000mg/kg; BHT 100 mg/kg.  
1058 FEEDOX® DRY antioxidante. \*\*Premix mineral para frangos de corte (kg/produto). Ferro (mín) 60 g/kg; Cobre (mín)  
1059 8.000mg/kg; Manganes (mín) 80 g/kg; Zinco (mín) 80 g/kg; Iodo (mín) 1.000 mg/kg; Selenio (mín) 300 mg/kg.  
1060

### 1061 **3.2.3.2 Seleção de cepas de *Salmonella* Enteritidis resistentes para inoculação na** 1062 **ração**

1063 Para a obtenção de células viáveis de *Salmonella* Enteritidis para inoculação na  
1064 ração, foi necessário realizar a pré-adaptação das cepas com objetivo de aumentar sua

1065 resistência a ambiente com baixa umidade. Utilizou-se metodologia adaptada de Yoon  
1066 et al. (2013). As cepas foram ativadas em 10 mL de caldo TSB e incubadas por 24h a  
1067 37 °C. Em seguida, preparou-se o *pool* de *Salmonella* em 9,5 mL de TSB, adicionando  
1068 100 µL de das 5 cepas, e incubou-se por 20h a 37 °C. O *pool* de *Salmonella* foi exposto  
1069 a concentrações sequenciais de NaCl, onde 100 µL do *pool* foram diluídos em 10 mL de  
1070 caldo TSB contendo 2% de NaCl, incubado por 24h a 37 °C. Após este período, 100 µL  
1071 foram coletados e diluídos em 10 mL de caldo TSB com 4% de NaCl, incubado por 24h  
1072 a 37 °C. Após a exposição ao NaCl, 100 µL do caldo foram semeados em placas ágar  
1073 Padrão para Contagem - PCA (Kasvi, Itália) contendo 4% NaCl, incubadas por 24h a 37  
1074 °C. As colônias crescidas no Agar foram consideradas adaptadas ao meio e utilizadas  
1075 para a inoculação na ração (Figura 4).

1076



1077 Figura 4. Procedimento de exposição de *Salmonella* Enteritidis ao aumento sequencial da concentração  
1078 de NaCl no meio.

1079

1080 **3.2.3.3 Preparo do inóculo**

1081 Após o procedimento descrito na Figura 4, amostras das colônias foram  
1082 coletadas por raspagem com uma alça de inoculação e diluídas em 10 mL de caldo  
1083 TSB contendo 4% NaCl e incubadas por 20h a 37 °C para posterior aplicação na ração.  
1084

#### 1085 **3.2.3.4 Inoculação da *Salmonella* Enteritidis na ração**

1086 O volume de 1,6 mL do *pool* ativado de *Salmonella* Enteritidis, adaptada ao meio  
1087 de baixa umidade, foi inoculado em 160 g de ração e, posteriormente, homogeneizado  
1088 por 2 minutos com o auxílio de mixer (Braun 300 Watt, Barcarena, Queluz de Baixo,  
1089 Portugal).

1090

#### 1091 **3.2.3.5 Tratamento da ração com antimicrobianos de origem natural**

1092 A CIM dos antimicrobianos obtida *in vitro* foi aumentada para verificar seu efeito  
1093 antimicrobiano quando adicionados na ração. Para aplicação dos antimicrobianos na  
1094 ração foi preparada uma solução mãe contendo 4,80 mL de água deionizada + 2,09 mL  
1095 de ácido caproico + 75 µL de isotiocianato de alila. As amostras de ração previamente  
1096 inoculadas com *Salmonella* foram pesadas e distribuídas em tubos de plástico com  
1097 tampa de rosca de 50 mL. Após a adição de diferentes concentrações de ITA e CAP  
1098 (Tabela 3), os tubos foram fechados hermeticamente e o conteúdo homogeneizado por  
1099 agitação manual por 60 segundos. Um controle positivo, sem a adição de ITA e CAP,  
1100 também foi realizado. As amostras foram estocadas à temperatura ambiente por um  
1101 período de 8 dias para a determinação da sobrevivência de *Salmonella*.

1102

1103 Tabela 3 - Tratamentos de ITA e CAP adicionados à ração de frangos para controle de  
1104 *Salmonella* Enteritidis

Componente	Concentração de antimicrobiano natural na ração			
	T1	T2	T3	T4
Ração (g)	19,8	19,6	19,4	19,2
Solução mãe (µL)	-	200	400	600
ITA (ppm)	-	62,5	125	187
CAP (ppm)	-	175	350	525

1105 Os testes foram feitos em tubos de 50 mL, em duplicatas. As doses dos antimicrobianos presentes na  
1106 solução mãe estão apresentadas em ppm para o óleo e para o ácido, ambos com pureza acima de 95 %.  
1107 (-) Não se aplica dado numérico.

### 1108 **3.2.3.6 Contagem de *Salmonella* Enteritidis na ração**

1109  
1110 As determinações de *Salmonella* foram realizadas, em duplicata, nos tempos de  
1111 estocagem 0, 2, 4, 6 e 8 dias. Para isso, 10g de ração foram diluídas em 90 mL de água  
1112 peptonada a 1% (Kasvi, Itália), e homogeneizadas em Stomacher (Iul Instruments,  
1113 Barcelona, Spain) por 30 segundos. As amostras foram posteriormente pré-incubadas  
1114 em estufa a 37 °C por 1 h, para permitir a recuperação de células bacterianas  
1115 injuriadas. Para o procedimento de contagem de células viáveis, as amostras foram  
1116 submetidas a diluições decimais seriadas em tubos com 10 mL de água peptonada  
1117 0,1%. A semeadura das diluições foi realizada em placas com Agar Xilose-Lisina  
1118 Deoxicolato (XLD) (HiMedia, Itália), incubadas em estufa a 37°C por 24 h, para posterior  
1119 contagem de colônias, os resultados foram expressos em log UFC/g.

1120

### 1121 **3.2.4 Determinação de pH na ração contendo antimicrobianos**

1122 Para a mensuração do pH, amostras de ração com inclusão de isotiocianato de  
1123 alila e ácido caproico foram coletadas ao final de cada tempo (metodologia adaptada de  
1124 Krause et al., 1994). Posteriormente, 9,0 g de cada ração foram suspensos em 10 mL  
1125 de água deionizada, formando uma massa homogênea. Os valores de pH foram obtidos  
1126 utilizando um pHmetro da marca *Hanna* modelo Meat pH meter HI 99163.

1127

### 1128 **3.2.5 Experimento 4: Simulação da digestão *in vitro* de frangos de corte**

#### 1129 **3.2.5.1 Preparo do inóculo**

1130 O inóculo foi preparado pela ativação das cepas de *Salmonella* Enteritidis 9USP,  
1131 33SUSP, CRIFS1016 6FP, 56301 e CRIFS em 8 mL de caldo TSB incubado por 24 h a  
1132 37°C. Em seguida, preparou-se o *pool* de *Salmonella* em 9,5 mL de TSB, adicionando  
1133 100 µL de das 5 cepas, e incubou-se por 2h a 37 °C. O inóculo de *Lactobacillus*  
1134 *plantarum* foi preparado pela ativação de cinco cepas de *L. plantarum* em 8 mL de  
1135 caldo MRS (Kasvi, Itália), por 24 h a 37°C. Em seguida, foi preparado um *pool*  
1136 adicionando 100 µL de cada cepa em 9,5 mL de caldo MRS e incubado em estufa por 2  
1137 h a 37°C.

### 1138 **3.2.5.2 Preparo dos antimicrobianos naturais**

1139  
1140 O tratamento contendo 187 ppm de ITA e 525 ppm de CAP (T4) foi selecionado  
1141 para o teste de simulação da digestão *in vitro* por ter apresentado o melhor resultado  
1142 para inibição de *Salmonella* na ração de frango (fase inicial). Esses antimicrobianos  
1143 foram previamente adicionados em uma solução mãe contendo 4,8 mL de água  
1144 deionizada esterilizada + 37,5 µL de isotiocianato de alila + 1,045 mL ácido caproico.

1145

### 1146 **3.2.5.3 Simulação da digestão *in vitro* de frangos de corte**

1147

1148 O modelo da digestão *in vitro* utilizado neste trabalho foi desenvolvido visando  
1149 reproduzir o processo de digestão que ocorre naturalmente no organismo de frangos de  
1150 corte. O experimento foi realizado em erlenmeyer de 125 mL a temperatura de 41,4°C,  
1151 mantida com o auxílio de banho-maria (Dubnoff - Modelo TE-053 – Tecnal, São Paulo,  
1152 Brasil) com controle de agitação. A digestão foi realizada em cinco etapas que  
1153 simularam os seguintes compartimentos do sistema digestório de frangos de corte:  
1154 papo, proventrículo, moela, intestino delgado e intestino grosso, em um tempo total de  
1155 4h20min. Os tratamentos foram T1 – Controle (ração basal) e T2 ração basal com  
1156 adição de antimicrobianos (187 ppm de ITA e 525 ppm de CAP).

1157

### 1158 **3.2.5.4 Simulação da digestão no papo**

1159 Neste compartimento foram utilizados 5,0 g de ração, 10 mL de água deionizada  
1160 estéril, ajustando o pH para 6,0 com uma solução de HCl 1M. O tempo de digestão  
1161 neste compartimento foi de 30 minutos, de acordo com Chang e Chen (2000) e  
1162 Fengying et al. (2011).

### 1163 **3.2.5.5 Simulação da digestão no proventrículo**

1164 No mesmo erlenmeyer contendo a solução representativa do papo foi adicionado  
1165 25 mL de água deionizada autoclavada, ajustado o pH para 2,5 com uma solução 1M  
1166 de HCl e adicionadas 3.850 U/mL de pepsina (Sigma, USA, Saint Louis). O tempo de

1167 permanência nesta etapa foi de 30 minutos (Fengying, et al 2011; Wali e Beal, 2011;  
1168 Walk et al., 2015).

#### 1169 **3.2.5.6 Simulação da digestão na moela**

1170 Foram adicionadas à solução anterior bolas de vidro para a simulação da  
1171 digestão mecânica que ocorre na moela. Colocou-se o sistema sob agitação de 220  
1172 rpm, além de ajustar o pH para 3,0 com uma solução 1M de NaHCO<sub>3</sub>. O tempo de  
1173 permanência nesta etapa foi de 60 minutos (Moran 1982; Bertechini 1998; Chang e  
1174 Chen 2000; Martinez-Haro et al., 2009).

#### 1175 **3.2.5.7 Simulação da digestão no intestino delgado**

1176 À solução da digestão da moela foram adicionadas 8,0 U/mL de pancreatina e  
1177 135 mg de sais biliares (Sigma, EUA, Saint Louis). Ajustou-se o pH para 6,2, com uma  
1178 solução de NaHCO<sub>3</sub> 1M. O tempo de permanência nesta etapa foi de 120 minutos  
1179 (Bertechini, 1998; Martinez-Haro et al, 2009; Wali e Beal, 2011; Walk et al 2015).

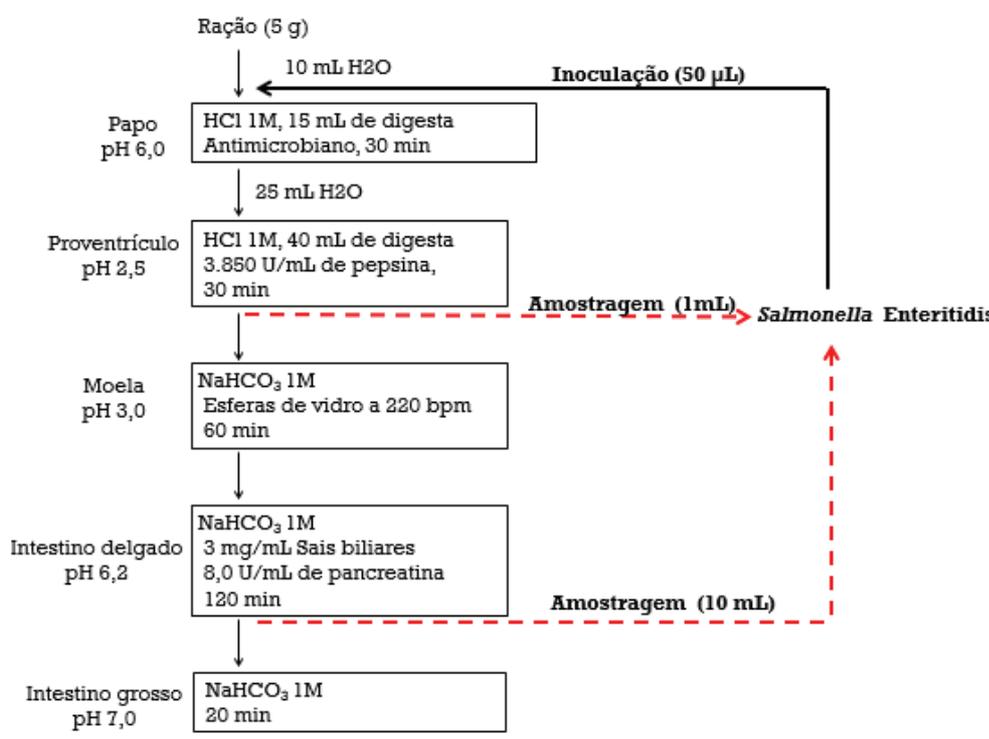
#### 1180 **3.2.5.8 Simulação da digestão no intestino grosso**

1181 Após o término da simulação da digestão no intestino delgado, o pH da solução  
1182 foi ajustado para 7,0, através de uma solução 1M de NaHCO<sub>3</sub>. O tempo de permanência  
1183 nesta etapa foi de 20 minutos (Moran, 1982; Bertechini, 1998; Chang e Chen, 2000).

#### 1184 **3.2.5.9 Avaliação do efeito dos antimicrobianos naturais após digestão *in vitro*** 1185 **sobre *Salmonella* Enteritidis e sobre *Lactobacillus plantarum***

1186  
1187 A avaliação do efeito antibacteriano da combinação de 187,5 ppm de ITA e 525  
1188 ppm de CAP foi realizada em diferentes compartimentos simulados do trato digestório  
1189 de frangos de corte. Para tanto, um *pool* de *Salmonella* Enteritidis e um *pool* de  
1190 *Lactobacillus plantarum* pertencentes ao banco de cepas do laboratório de LTPA, foram  
1191 utilizados. O efeito dos antimicrobianos adicionados na digesta sobre as bactérias  
1192 testadas foi avaliado pela contagem de células viáveis após a passagem por algumas  
1193 etapas do processo digestivo.

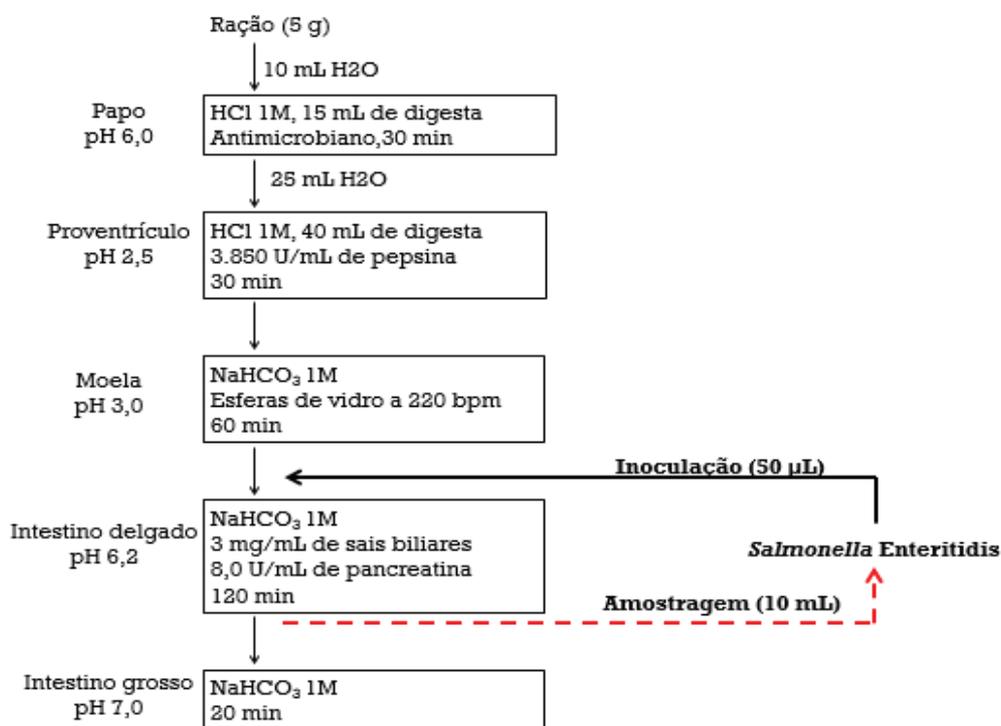
1194 No primeiro teste, 50  $\mu$ L do *pool* de *Salmonella* Enteritidis contendo  
 1195 aproximadamente  $10^7$  UFC/mL foram inoculados em 15 mL de digesta, com pH de 6,0,  
 1196 composta de 5 g de ração de frango e 10 mL de água deionizada estéril, no  
 1197 compartimento que representava o papo. Em seguida, foram adicionados à digesta 150  
 1198  $\mu$ L de solução mãe contendo 187,5 ppm de ITA e 525 ppm de CAP, que permaneceram  
 1199 nessas condições durante 30 minutos. Após o tempo de digestão no proventrículo e no  
 1200 intestino delgado, alíquotas da digesta desses compartimentos foram coletadas para a  
 1201 contagem das células viáveis (Figura 5). No proventrículo, a alíquota correspondeu a  
 1202 um volume de 1 mL e no intestino delgado, a alíquota foi de 10 mL.



1203  
 1204 Figura 5: Procedimento de digestão simulada da ração de frango adicionada de antimicrobianos naturais  
 1205 para avaliação da sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis.  
 1206

1207 No segundo teste, no início da digestão no papo, foram adicionados 150  $\mu$ L de  
 1208 solução mãe contendo 187,5 ppm de ITA e 525 ppm de CAP em 5 g de ração de frango  
 1209 em fase inicial. Após o tempo de digestão no papo, proventrículo e na moela, foi  
 1210 inoculado 50  $\mu$ L do *pool* de *Salmonella* Enteritidis com aproximadamente  $10^7$  UFC/mL  
 1211 em 40 mL de digesta e pH de 6,2, no compartimento que representava o intestino  
 1212 delgado, sendo o tempo de permanência das bactérias nessas condições de 120 min

1213 (Figura 6). Ao término da digestão no intestino delgado uma alíquota da digesta foi  
 1214 coletada para contagem das células viáveis de *Salmonella* Enteritidis.  
 1215

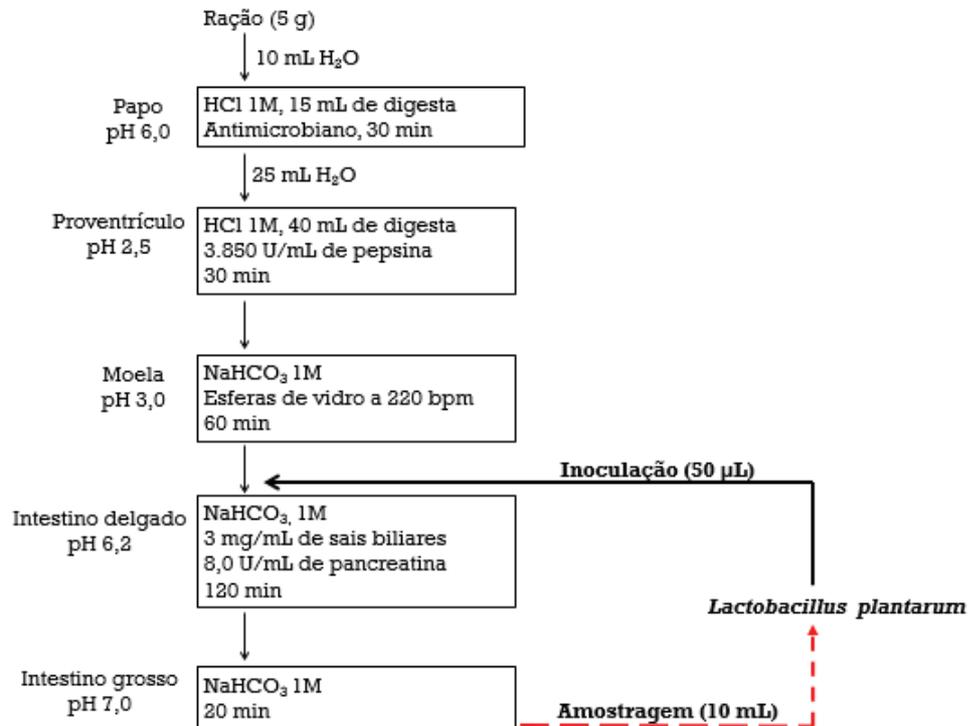


1216  
 1217 Figura 6: Procedimento de digestão simulada da ração de frango adicionada de antimicrobianos naturais  
 1218 para avaliação da sobrevivência de *Salmonella* Enteritidis.  
 1219

1220 A contagem de *Salmonella* foi realizada pela diluição seriada da amostra em  
 1221 água peptonada 0,1 %. Volumes de 100 µL das diluições foram semeados por  
 1222 superfície em placa contendo ágar XLD. As placas foram incubadas em estufa a 37°C  
 1223 por 24h para a posterior contagem de colônias e o resultado expresso em log UFC/mL.

1224 O terceiro teste foi realizado para verificar o efeito da combinação de  
 1225 antimicrobianos sobre a microbiota intestinal benéfica, representada por um *pool* de  
 1226 cepas de *L. plantarum*. No início da digestão no papo, contendo 5 g de ração, foram  
 1227 adicionados 150 µL de solução mãe contendo 187,5 ppm de ITA e 525 ppm de CAP.  
 1228 Após o tempo de digestão nos compartimentos que representavam o papo,  
 1229 proventrículo e moela, foi inoculado o *pool* de *L. plantarum* em ± 40 mL de digesta com  
 1230 pH ajustado para 6,2, no compartimento que representava o intestino delgado, o tempo  
 1231 de permanência neste compartimento de 140 min (Figura 7). Ao término da digestão no

1232 intestino grosso uma alíquota da digesta foi coletada para contagem das células viáveis  
1233 de *Lactobacillus plantarum*.



1234  
1235 Figura 7: Procedimento de digestão simulada da ração de frango adicionada de antimicrobianos naturais  
1236 para avaliação da sobrevivência de *Lactobacillus plantarum*.

1237  
1238 Para realizar a contagem das culturas de *L. plantarum*, foi realizada diluição  
1239 seriada da amostra em água peptonada 0,1 %. Em seguida, volumes de 1,0 mL das  
1240 diluições foram semeados em profundidade em Agar MRS. As placas foram incubadas  
1241 em estufa a 37°C por 48h para a posterior contagem das colônias e o resultado  
1242 expresso em log UFC/mL.

1243

### 1244 3.2.7 Análise Estatística

1245 Os resultados dos tratamentos na ração foram submetidos à análise de variância  
1246 (ANOVA), e as médias comparadas pelo teste Tukey. Os resultados referentes aos  
1247 experimentos de digestão simulada foram analisados pelo teste *t*. Em todas as análises,  
1248 utilizou-se nível de significância de 95% ( $P < 0,05$ ) e o programa estatístico  
1249 Statgraphics® 4.1.

## 1250 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1251 3.3.1 Experimento 1: Concentração inibitória mínima (CIM)

1252  
1253 Os óleos essenciais, assim como os ácidos orgânicos apresentaram atividade  
1254 antibacteriana nas avaliações *in vitro* contra *Salmonella* Enteritidis. A menor CIM entre  
1255 os óleos essenciais foi encontrada para ITA (25 ppm), sendo a do carvacrol de 150  
1256 ppm. Nos testes com os ácidos orgânicos, a menor CIM foi obtida com o ácido caproico  
1257 (70 ppm), sendo a do propiônico de 75 ppm.

1258 A CIM do ITA contra *Salmonella* Enteritidis em pH 6,0, encontrada neste  
1259 experimento, foi menor comparada a CIM de 31 ppm de ITA determinada por  
1260 Palaniappan e Holley (2010) em pH 5,0 contra *S. Typhimurium* em temperatura de 37  
1261 °C. A CIM do ITA determinada por Olaimat e Holley (2013) contra cepas de *Salmonella*  
1262 Enteritidis *in vitro* foi de 80 ppm. Luciano e Holley (2009) relataram a CIM de 25 ppm de  
1263 ITA em pH de 4,5 teve efeito antibacteriano contra *Escherichia coli* O157:H7.

1264 O ITA possui atividade antibacteriana contra um amplo espectro de micro-  
1265 organismos patogênicos (Palaniappan e Holley, 2013). Além disso, a CIM do ITA não  
1266 se apresenta de forma constante, podendo ser influenciada por diversos fatores, tais  
1267 como, a interação entre o agente antibacteriano e a célula bacteriana a temperatura e o  
1268 estado fisiológico das células (Olaimat e Holley, 2013).

1269 Os resultados de CIM obtidos para os ácidos orgânicos encontrados neste  
1270 estudo foram menores comparados aos valores obtidos por Van Immerseel et al. (2003  
1271 e 2004), que relatam efeitos bacteriostáticos significativos contra *Salmonella* Enteritidis  
1272 em concentrações de 116 ppm de ácido caproico e 185 ppm de ácido propiônico.  
1273 Hermans et al. (2010) utilizaram ácido caproico *in vitro* para inibir o crescimento de *C*  
1274 *Campylobacter jejuni* e observaram que a CIM foi de 3 ppm. Os autores relatam que *C.*  
1275 *jenuni* é mais sensível a antimicrobianos naturais que a *Salmonella* Enteritidis. Os  
1276 valores de CIM dos ácidos são dependentes do pH do meio, devido ao aumento da  
1277 dissociação dos ácidos em ambientes neutros. Os ácidos orgânicos de cadeia curta e  
1278 média são mais eficazes no controle de *Salmonella* pela capacidade de atravessarem  
1279 através da membrana celular em baixo pH (Van Immerseel et al., 2003; 2004).

1280 **3.3.2 Experimento 2: Efeito combinado de óleos essenciais e ácidos orgânicos**  
1281 **sobre a *Salmonella* Enteritidis**

1282  
1283 Foi observado que houve interação entre a associação de 6,25 ppm de ITA e  
1284 17,5 ppm de CAP, com valor de IFIC  $\leq 0,5$ , sendo a menor CIM combinada que teve  
1285 efeito contra *S. Enteritidis*. A associação de 12,5 ppm de ITA e 75 ppm de PROP não  
1286 apresentou efeito sinérgico. O CV não apresentou efeito sinérgico com os ácidos  
1287 orgânicos CAP e PROP nas concentrações testadas. Porém, foi observado efeito  
1288 sinérgico com a associação de 8,75 ppm de CAP e 9,37 ppm de PROP (Tabela 4).

1289  
1290 Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (CIM) dos antimicrobianos naturais em  
1291 combinação contra *Salmonella* Enteritidis *in vitro* e índice de concentração  
1292 inibitória fraciona (IFIC)

Antimicrobianos naturais	CIM ppm	IFIC
CV + PROP	75,0 + 75,0	0,9
CV + CAP	75,0 + 35	1,0
ITA + CV	12,5 + 75,0	0,9
ITA + CAP	6,25 + 17,5	0,5
ITA + PROP	12,5 + 75,0	1,0
CAP + PROP	8,75 + 9,37	0,25

1293 Óleo essencial = ppm, ácido orgânico = ppm. Sinergia = IFIC  $\leq 0,5$ . IFIC  $> 0,5$  ou  $< 4,0$  indica ausência de  
1294 interação. Efeito antagônico FICI  $\geq 4,0$ . Isotiocianato de alila (ITA), carvacrol (CV), ácido caproico (CAP),  
1295 ácido propiônico (PROP) testados em caldo TSB com pH ajustado para 6,0.  
1296

1297 A combinação de ITA e CAP apresentou efeito sinérgico contra *Salmonella*  
1298 Enteritidis, reduzindo consideravelmente a CIM individual de cada antimicrobiano. Até o  
1299 presente momento não há dados na literatura que demonstrem efeitos positivos ou  
1300 negativos da combinação destes dois aditivos naturais contra *Salmonella* Enteritidis *in*  
1301 *vitro* ou até mesmo *in vivo*. Este estudo sugere que a interação de um óleo essencial  
1302 (ITA) com um ácido orgânico (CAP), com distintos mecanismos de ação antimicrobiano,  
1303 pode ter produzido adição de efeito, potencializando sua ação e reduzindo a resistência  
1304 bacteriana, indicando que combinação destes compostos pode ter feito contra um  
1305 amplo espectro de micro-organismos em diferentes condições.

1306 **3.3.3 Experimento 3: Atividade antibacteriana da combinação de ITA e CAP**  
 1307 **adicionados à ração**  
 1308

1309 Foi observada redução significativa ( $P < 0,05$ ) na contagem de *Salmonella*  
 1310 Enteritidis na ração adicionada da combinação de ITA e CAP. O tratamento T4 diferiu  
 1311 do T1 (controle positivo) em todos os dias de análise, e a partir do dia 6 o tratamento T4  
 1312 reduziu a contagem de *Salmonella* Enteritidis na ração a níveis indetectáveis (Tabela  
 1313 5).

1314  
 1315 Tabela 5 - Contagem de *Salmonella* Enteritidis (log UFC/g) em ração de frango tratada  
 1316 com diferentes concentrações da combinação de isotiocianato de alila (ITA)  
 1317 e ácido caproico (CAP) durante 8 dias

Contagem de <i>Salmonella</i> Enteritidis na ração				
Tempo	T1	T2	T3	T4
0	3,25 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	2,72 ± 0,18 <sup>ABa</sup>	2,81 ± 0,05 <sup>ABa</sup>	2,63 ± 0,21 <sup>Ba</sup>
2	3,36 ± 0,03 <sup>Aab</sup>	2,84 ± 0,34 <sup>ABa</sup>	2,84 ± 0,08 <sup>ABa</sup>	2,39 ± 0,13 <sup>Bab</sup>
4	2,84 ± 0,08 <sup>Ab</sup>	2,56 ± 0,22 <sup>ABa</sup>	2,11 ± 0,05 <sup>Bb</sup>	2,11 ± 0,05 <sup>Bb</sup>
6	2,54 ± 0,19 <sup>Ac</sup>	2,19 ± 0,27 <sup>ABa</sup>	1,84 ± 0,08 <sup>Bbc</sup>	<1,00 ± 0,00 <sup>Cc</sup>
8	2,33 ± 0,04 <sup>Ac</sup>	2,24 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	1,69 ± 0,13 <sup>Bc</sup>	<1,00 ± 0,00 <sup>Cc</sup>

1318 <sup>ABC</sup> Letras maiúsculas representam diferença estatística na mesma linha ( $P < 0,05$ ); <sup>abc</sup>Letras minúsculas  
 1319 representam diferença estatística na mesma coluna ( $P < 0,05$ ); Os resultados estão expressos em Médias  
 1320 ± Desvio Padrão (DP). T1: Controle; T2: 62,5 ppm+175 ppm (200 µL); T3: 125 ppm+350 ppm (400 µL);  
 1321 T4: 187,5 ppm+525 ppm (600 µL). Limite de detecção 1,25 log de UFC/ g.  
 1322

1323 Os valores de pH da ração, obtidos após cada período, estão apresentados na  
 1324 Tabela 6. A ração apresentou pH médio de 5,6 antes da adição dos tratamentos. Foi  
 1325 observada redução significativa nos valores de pH da ração no T4, em comparação aos  
 1326 demais tratamentos no dia 0 e 8 ( $P < 0,05$ ). Nos dias 2, 4 e 6 não houve diferença  
 1327 estatística entre os tratamentos. Em relação ao tempo de análise, foi observado  
 1328 aumento significativo nos valores de pH da ração entre o dia 0 e o dia 8 nos  
 1329 tratamentos T1, T2 e T4 e apenas o T3 manteve seu pH estável durante o período  
 1330 analisado. Os resultados sugerem que provavelmente a volatilização é possível

1331 degradação dos compostos, juntamente com a capacidade tamponante da ração,  
1332 podem ter contribuído para elevação do pH com o passar o tempo.

1333  
1334 Tabela 6 - Efeito da adição de isotiocianato de alila e ácido caproico no pH da ração de  
1335 frangos de corte

Tempo	Valores de pH da Ração			
	T1	T2	T3	T4
0	5,48 ± 0,07 <sup>Aa</sup>	5,46 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	5,42 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	5,28 ± 0,10 <sup>Ba</sup>
2	5,40 ± 0,06 <sup>Aa</sup>	5,43 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	5,38 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	5,35 ± 0,10 <sup>Aa</sup>
4	5,43 ± 0,04 <sup>Aa</sup>	5,40 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	5,46 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	5,42 ± 0,01 <sup>Aab</sup>
6	5,47 ± 0,09 <sup>Aa</sup>	5,52 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	5,51 ± 0,02 <sup>Aa</sup>	5,48 ± 0,02 <sup>Aab</sup>
8	5,79 ± 0,02 <sup>Ab</sup>	5,78 ± 0,02 <sup>Ab</sup>	5,72 ± 0,03 <sup>Ba</sup>	5,56 ± 0,03 <sup>Cb</sup>

1336 <sup>ABC</sup>Letras maiúsculas representam diferença estatística na mesma linha (P<0,05); <sup>abc</sup>Letras minúsculas  
1337 representam diferença estatística na mesma coluna (P<0,05); Os resultados são expressos em Médias ±  
1338 Desvio Padrão (DP). T1: Controle; T2: 62,5 ppm+175 ppm (200 µL); T3: 125 ppm+350 ppm (400 µL); T4:  
1339 187,5 ppm+525 ppm (600 µL).

1340  
1341 A atividade bactericida de muitos aditivos naturais disponíveis para uso em grãos  
1342 e em rações é dependente principalmente do pH que pode influenciar no seu efeito  
1343 antimicrobiano, no entanto, além do efeito na redução de bactérias, outros benefícios  
1344 têm sido relatados com o uso de aditivos de origem natural. Windisch et al. (2008)  
1345 relataram que os principais efeitos dos OEs são: a redução na ingestão de alimento  
1346 aumento no ganho de peso e a melhoria na conversão alimentar. Essa melhoria pode  
1347 ser atribuída ao efeito antimicrobiano dos OEs (Johny et al., 2010; Bona et al., 2012)  
1348 contra bactérias patogênicas, reduzindo a contaminação na ração e no trato  
1349 gastrointestinal, evitando o surgimento de doenças entéricas nos animais.

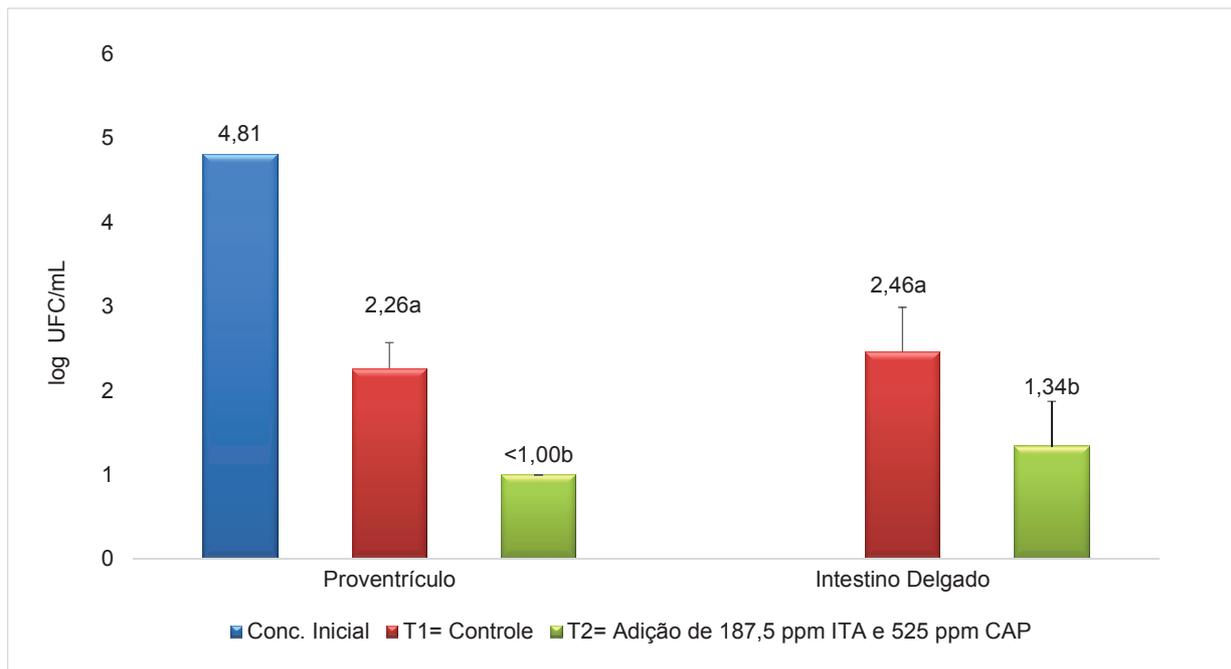
1350 A inclusão de ácidos orgânicos na alimentação animal inibe o crescimento  
1351 *Salmonella* e *Escherichia coli* causadores de doenças (Sterzo et al., 2007), pela  
1352 capacidade em reduzir o pH dos alimentos e do trato digestório dos animais (Mroz,  
1353 2005). Maiorka et al. (2004) utilizaram 0,05% de uma mistura de ácidos orgânicos  
1354 (fumárico, láctico e cítrico) na dieta de frangos de corte na fase inicial e observaram  
1355 melhora no desempenho dos animais (Ricke, 2003), reduzindo a presença de micro-

1356 organismos patogênicos (*E. coli*, *Salmonella* e *Campylobacter*) na dieta. No presente  
1357 estudo foi observado que a associação de um óleo essencial (ITA) e um ácido orgânico  
1358 (CAP), reduziu a presença de *Salmonella* Enteritidis na ração. Sendo assim, pode se  
1359 sugerir que a combinação entre esses antimicrobianos naturais na dieta das aves,  
1360 podem reduzir a contaminação por micro-organismos patogênicos. No entanto, mais  
1361 estudos são necessários para esclarecer se a combinação de óleos essenciais e ácidos  
1362 orgânicos é capaz de promover os mesmos efeitos dos antibióticos como aditivos em  
1363 dietas de frangos de corte. Este experimento fornece informações que podem contribuir  
1364 novos experiemntos com aditivos naturais contra bactérias patogênicas na produção de  
1365 frangos corte que possam ser utilizados como melhoradores de desempenho animal.

#### 1366 **3.3.4 Experimento 4: Efeito dos antimicrobianos naturais contra *Salmonella*** 1367 **Enteritidis e *Lactobacillus plantarum* após digestão *in vitro*** 1368

1369 Nos testes realizados a partir da digestão simulada *in vitro* com inoculação de  
1370 *Salmonella* Enteritidis no início da digestão (papo), utilizando a combinação de ITA e  
1371 CAP, a contagem de *Salmonella* Enteritidis no proventrículo foi de 2,26 log UFC/mL no  
1372 controle (T1) e no T2 foi reduzida a níveis indetectáveis (<1,25 log UFC). No intestino  
1373 delgado, a contagem foi 2,46 log UFC/mL para o T1 e 1,34 log de UFC/mL para o T2  
1374 (Figura 8).

1375 A redução de 2,55 log UFC/mL de *S. Enteritidis* (T1) no proventrículo obtida no  
1376 presente estudo, foi inferior à relatada por Wali e Beal (2011) em simulação da digestão  
1377 de frangos sem inclusão de qualquer tratamento, onde observaram redução de 3 log  
1378 UFC/g de *S. Typhimurium* após exposição ao baixo pH do proventrículo/moela. No  
1379 entanto, com a adição da combinação de ITA e CAP houve uma redução superior a  
1380 3,81 log UFC/ml na população de *S. Enteritidis* (T2). O baixo pH do proventrículo e da  
1381 moela funcionam como uma barreira química contra o crescimento bacteriano. Além  
1382 disso, a acidez destes compartimentos pode ter contribuído para o efeito bacteriostático  
1383 dos antimicrobianos naturais, pois o ITA apresenta maior eficácia contra bactérias em  
1384 meio ácido (Olaimat e Holley, 2013), podendo justificar a redução de *S. Enteritidis* para  
1385 níveis indetectáveis com a inclusão de ITA + CAP no proventrículo.



1386  
 1387 Figura 8 – Contagem de *S. Enteritidis* (log UFC/mL) em ração de frango adicionada da combinação de  
 1388 ITA + CAP após a digestão simulada *in vitro*. Limite de detecção <1,25 log UFC. Letras  
 1389 minúsculas diferentes representam diferença estatística ( $P < 0,05$ ) em cada etapa da digestão.

1390  
 1391 Além da acidez do proventrículo favorecer a diminuição na contagem de  
 1392 *Salmonella* Enteritidis, outro efeito seria a não dissociação do ácido caproico, mantendo  
 1393 seu caráter lipofílico (Pickler et al., 2012), penetrando a membrana celular bacteriana de  
 1394 forma passiva para o interior do citoplasma, dissociando-se e liberando íons  $H^+$ , que  
 1395 consequentemente, reduzem o pH intracelular (Mroz, 2005; Pickler et al., 2012). Este  
 1396 efeito altera as funções normais das células bacterianas (Van Immersseel et al., 2006;  
 1397 Suryanarayana et al., 2012), aumentando a difusão dos ácidos para o citoplasma (Mani-  
 1398 Lopez et al., 2012), suprimindo o sistema enzimático, o transporte de nutrientes e a  
 1399 síntese de aminoácidos, ATP e DNA, provocando esgotamento energético e a morte  
 1400 bacteriana (Lückstädt e Mellor, 2011).

1401 Pode-se dizer que a combinação de ITA + CAP teve efeito em todo trato  
 1402 digestório, no entanto, o baixo pH pode fazer com que o grupamento isotiocianato,  
 1403 altamente reativo e com grande potencial eletrofílico presentes na estrutura do ITA  
 1404 (Turgis et al., 2009; Zhang, 2012; Dufour et al., 2015), interagisse com a camada  
 1405 lipopolissacarídeo (LPS) das bactérias, alterando seu caráter hidrofóbico (Carson et al.,

1406 2002), provocando perdas de material citoplasmático por extravasamento. O ITA pode  
1407 reagir com proteínas e enzimas no interior das células (Dufour et al., 2015),  
1408 prejudicando o metabolismo das bactérias (Jacob et al., 2003), provocando reação de  
1409 oxidação e hidroxilação de DNA, RNA, proteínas, lipídios e enzimas, resulta em morte  
1410 celular bacteriana (Dufour et al., 2013 e 2015). O ITA também pode inibir sítios de  
1411 ligações de ATP e de P-ATPase em bactérias (Breier e Ziegelhoffer, 2000), reduzindo o  
1412 consumo de oxigênio e o teor de ATP intracelular.

1413 Na simulação da digestão no intestino delgado (pH 6,2), houve menor (1,12 log  
1414 UFC/mL) redução das células de *S. Enteritidis* entre T1 e T2 quando comparado à  
1415 redução observada no proventrículo, além disso, foi observado uma recuperação das  
1416 células bacterianas (Figura 8). Uma explicação para este fato é que após passagem  
1417 pelo proventrículo as células viáveis não cultiváveis de *Salmonella* Enteritidis, quando  
1418 em condições favoráveis de pH no intestino delgado voltaram a crescer. Em estudo de  
1419 digestão *in vitro* de suínos simulando o intestino delgado, Michiels et al. (2007)  
1420 verificaram que a combinação de 250 ppm de carvacrol e 250 ppm de timol foi eficaz no  
1421 controle de bactérias anaeróbias totais (*E. coli*, *Streptococcus*), entretanto, reduziu  
1422 apenas 1 log UFC/mL, em pH 6,5 em um período de digestão de 3 a 4 h. A capacidade  
1423 de recuperação das células bacterianas no intestino delgado, após passagem pela  
1424 elevada acidez do proventrículo, está relacionada com a resposta ao estresse que  
1425 esses micro-organismos possuem (Silva et al., 2016). Essa tolerância múltipla ao  
1426 estresse é atribuída às várias mudanças fisiológicas que ocorrem nas bactérias, como,  
1427 mudanças na composição da parede celular e alterações morfológicas e o  
1428 desenvolvimento do gene de resposta ao ambiente ácido ATR (Merrell e Camilli, 2002),  
1429 aumentando as chances de sobrevivências desses micro-organismos ao ambiente do  
1430 trato gastrointestinal.

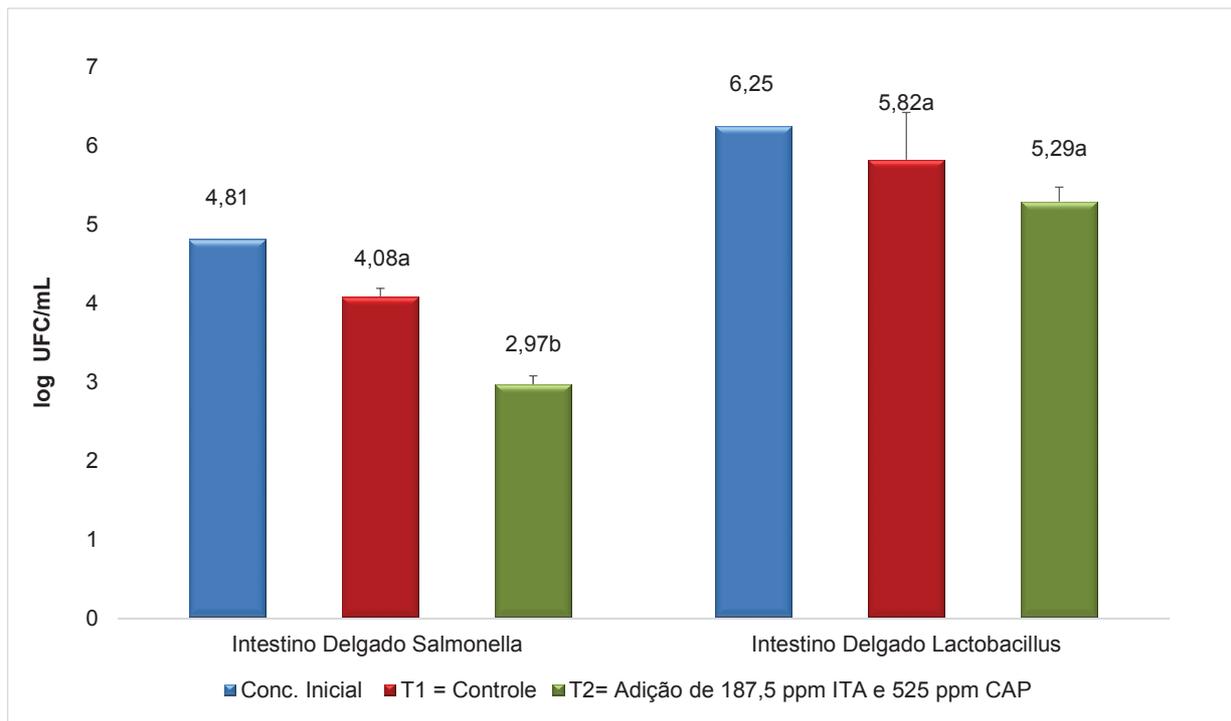
1431 Em outro estudo, Messens et al. (2010) utilizando 15 mM de caprilato de sódio,  
1432 um sal do ácido caprílico, simulando as condições do ceco de suínos, observaram  
1433 redução de 4,69 log UFC/mL de *Salmonella* Typhimurium e 3,62 logs de coliformes  
1434 totais, após o período de 4 dias. Goris et al. (2007), simulando as condições do ceco de  
1435 suínos, observaram redução de 3 log UFC/mL de *Salmonella* após o período de 3 dias,  
1436 pela inclusão de 15 mM de caprilato de sódio na ração para suínos. Para tal

1437 comparação na redução de *Salmonella* deve-se considerar o tempo de digestão *in vitro*  
1438 utilizado. Segundo Messens et al. (2010) em um curto período, o efeito antibacteriano  
1439 do caprilato de sódio é considerado fraco e mais lento que o ácido orgânico, pois o  
1440 caprilato necessitaria de um intervalo de tempo maior para atingir o ceco suíno em  
1441 concentração eficaz para inibir o crescimento bacteriano.

1442 No presente estudo, em outro teste realizado *in vitro*, com inoculação de  
1443 *Salmonella* Enteritidis e *Lactobacillus plantarum* separadamente no momento da  
1444 digestão no intestino delgado, utilizando a mesma combinação (187,5 ppm de ITA e  
1445 525 ppm de CAP), foi observado, após 120 min neste compartimento, redução  
1446 significativa ( $P < 0,05$ ) de 1,11 log UFC/mL de *Salmonella* Enteritidis, em relação ao T1  
1447 (Figura 9). Não foi observada diferença significativa (0,53 log UFC/mL) entre os  
1448 tratamentos na contagem de *Lactobacillus plantarum*. Wali e Beal (2011), observaram  
1449 que grande parte da população de *Lactobacillus salivarius* não foram afetados pela  
1450 passagem através do trato gastrintestinal de frangos, reduzindo 0,5 log UFC. Chang e  
1451 Chen (2000) simularam o aparelho digestório de frangos utilizando uma cultura mista de  
1452 *Lactobacillus*, observaram que após todo processo de simulação, não foi detectada a  
1453 presença *Campylobacter jejuni*. As espécies de *Lactobacillus* inibem o crescimento de  
1454 outros micro-organismos indesejáveis, competindo pelo mesmo substrato e sítios de  
1455 ligação na parede do intestino e sintetizam ácido láctico, que pode atuar como um  
1456 antimicrobiano no lúmen intestinal, além disso apresentam maior resistência às  
1457 alterações de pH do trato gastrintestinal (Ajuwon, 2015).

1458 Messens et al. (2010) observaram que o uso de caprilato de sódio reduziu a  
1459 presença de micro-organismos patogênicos durante a simulação da digestão no ceco  
1460 suíno, sem afetar bactérias produtoras de ácido láctico. Olaimat e Holley (2014),  
1461 verificaram que as bactérias produtoras de ácido láctico reduziram somente 0,66 log de  
1462 UFC com adição de 25 ppm o ITA. Estes autores sugerem que muitas dessas bactérias  
1463 lácticas apresentam certa resistência ao ITA, e que esse composto pode apresentar  
1464 mecanismos de ação específico para cada tipo de micro-organismo.

1465



1466  
 1467 Figura 9 - Contagem de *Salmonella* Enteritidis e *Lactobacillus plantarum* (log UFC/mL) no intestino  
 1468 delgado, após a digestão simulada de frango de corte. Limite de detecção <1,25 log UFC.  
 1469 Letras minúsculas diferem estatisticamente ( $P < 0,05$ ) para cada micro-organismo estudado.  
 1470

1471 De acordo com o que foi observado, a utilização de um modelo *in vitro* para  
 1472 simular o trato digestório de frangos de corte permitiu avaliar o efeito antimicrobiano dos  
 1473 compostos naturais ITA e CAP. Os resultados obtidos, como a inibição do crescimento  
 1474 de *Salmonella* Enteritidis na ração e no trato gastrintestinal, indicam que os  
 1475 antimicrobianos naturais podem vir a substituir o uso de antibióticos convencionais,  
 1476 contribuindo para melhorias no desempenho zootécnico de frangos de corte,  
 1477 principalmente na fase inicial, reduzindo os riscos de contaminação por bactérias.

1478 Bona et al. (2012) observaram que o uso de 100 ppm de uma mistura de óleos  
 1479 essenciais (orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta) na alimentação de frangos  
 1480 reduziu lesões específicas causadas no intestino por *Salmonella* Enteritidis, *Eimeria*,  
 1481 *Campylobacter* e *Clostridium*, além de diminuir as contagens das bactérias coletadas da  
 1482 cloaca das aves. Outros efeitos observados no trato gastrintestinal de frangos de corte  
 1483 com o uso de compostos naturais estão relacionados à melhora na conversão  
 1484 alimentar, morfologia intestinal e no desempenho zootécnico (Alçiçek et al., 2003;

1485 Maiorka et al., 2004; Windisch et al., 2008; Johnny et al., 2010). O interesse científico  
1486 pelo potencial dos antimicrobianos naturais adicionados às rações, tais como, óleos  
1487 essenciais e ácidos orgânicos deve-se a crescente proibição de antibióticos como  
1488 melhoradores de desempenho. No entanto, a simulação é uma das formas mais  
1489 rápidas, confiáveis e de baixo custo para se testar novas alternativas ao uso de  
1490 antibióticos evitando o uso indiscriminado dos animais em experimentação. Esta técnica  
1491 permite determinar de forma eficiente o efeito dos antimicrobianos naturais e estimar  
1492 possíveis benefícios aos animais antes da realização de testes *in vivo*, reduzindo os  
1493 custos experimentais e produzindo resultados seguros.

1494

1495

1496

1497

1498

1499

1500

1501

1502

1503

1504

1505

1506

1507

1508

1509

1510

1511

1512

1513

1514

1515

### 1516 3.4 CONCLUSÃO

1517

1518 O tratamento com 187,5 ppm de ITA e 525 ppm de CAP foi eficaz no controle de  
1519 *Salmonella* Enteritidis na ração de frangos, se apresentando como uma alternativa para  
1520 reduzir contaminação em ração, podendo evitar perdas econômicas provocadas por  
1521 doenças relacionadas a *S. Enteritidis* em aves e conseqüentemente em humanos. Na  
1522 simulação da digestão *in vitro*, a combinação de 187,5 ppm de ITA e 525 ppm de CAP  
1523 reduziu a contagem de *Salmonella* Enteritidis no proventrículo e no intestino delgado,  
1524 sem afetar a contagem de *Lactobacillus plantarum* após o trânsito intestinal. Os  
1525 resultados obtidos com os estudos *in vitro*, sugerem que esses compostos apresentam  
1526 potencial para reduzir colonização de bactérias patogênicas no trato gastrintestinal *in*  
1527 *vivo* contribuindo para a saúde do intestino dos animais, proporcionando melhorias nos  
1528 índices produtivos de frangos de corte.

1529

1530

1531

1532

1533

1534

1535

1536

1537

1538

1539

1540

1541

1542

1543

1544

1545

1546

## CAPÍTULO 4

1547

### 1548 **4 CONCLUSÃO GERAL**

1549

1550 Foi verificado efeito sinérgico dos compostos ITA e CAP contra *Salmonella*  
1551 *Enteritidis in vitro*. A adição de 187,5 ppm de ITA e 525 ppm de CAP foi eficaz contra  
1552 *Salmonella* Enteritidis na ração e nos testes de digestão *in vitro* de frangos de corte.  
1553 Apresentando potencial para a implantação no mercado, favorecendo o sistema  
1554 produtivo de frangos de corte e aumentando a segurança alimentar, uma vez que reduz  
1555 a população de *Salmonella* Enteritidis, sem afetar a população de *Lactobacillus*  
1556 *plantarum* no trato gastrintestinal simulado.

1557 No entanto, novos estudos devem ser realizados para avaliar o efeito desses  
1558 compostos nas mesmas concentrações, contra outras espécies patogênicas *in vitro*.  
1559 Ainda, sugere-se a realização de experimentos *in vivo* para avaliar o efeito das  
1560 combinações destes aditivos sobre a saúde intestinal e o desempenho de animais de  
1561 produção.

1562

## REFERÊNCIAS

- 1563  
1564  
1565 AGERBIRK N, OLSEN CE. Glucosinolate structures in evolution - Review.  
1566 Phytochemistry. 2012; 77: 16-45.
- 1567 AJUWON KM. Toward a better understanding of mechanisms of probiotics and  
1568 prebiotics action in poultry species. Journal of Applied Poultry Research. 2015; 074: 1-7.
- 1569 ALÇIÇEK A, BOZKURT M, ÇABUK M. The effect of an essential oil combination derived  
1570 from selected herbs growing wild in turkey on broiler performance. South African Journal  
1571 of Animal Science. 2003; 33: 89-94.
- 1572 ÁLVAREZ-ORDÓÑEZ A, PRIETO M, BERNARDO A, HILL C, LÓPEZ M. The acid  
1573 tolerance response of salmonella spp.: an adaptive strategy to survive i stressful  
1574 environments prevailing in foods and the host. Food Research International. 2012; 45:  
1575 482-492.
- 1576 Associação Brasileira de Proteína Animal. Exportações de carne de frango crescem  
1577 15,2% em novembro. <[http://abpa-br.com.br/noticia/artigos/todas/exportacoes-de-carne-](http://abpa-br.com.br/noticia/artigos/todas/exportacoes-de-carne-de-frango-crescem-152-em-novembro-1469)  
1578 [de-frango-crescem-152-em-novembro-1469](http://abpa-br.com.br/noticia/artigos/todas/exportacoes-de-carne-de-frango-crescem-152-em-novembro-1469)> Acessado em: 04/12/2015.
- 1579 AVANTAGGIATO G, HAVENAAR R, VISCONTI A. Assessing the zearalenone-binding  
1580 activity of adsorbent materials during passage through a dynamic in vitro gastrointestinal  
1581 model. Food and Chemical Toxicology. 2003; 41: 1283-1290.
- 1582 BAKKALI F, AVERBECK S, AVERBECK D, IDAOMAR M. Biological effects of essential  
1583 oils – A review. Food and Chemical Toxicology. 2008; 46: 446-475.
- 1584 BASSAN JDL, FLÔRES ML, ANTONIAZZI T, BIANCHI E, KUTTEL J, TRINDADE MM.  
1585 Controle da infecção por *Salmonella* Enteritidis em frangos de corte com ácidos  
1586 orgânicos e mananoligossacarídeo. Ciência Rural. 2008; 38: 1961-1965.
- 1587 BELDA-GALBIS CM, LEUFVÉN A, MARTÍNEZ A, RODRIGO D. Predictive microbiology  
1588 quantification of the antimicrobial effect of carvacrol. Journal of Food Engineering. 2014;  
1589 141: 34-43.

- 1590 BERTECHINI AG. Fisiologia da digestão de aves e suínos. Lavras, MG: ESAL/FAEPE;  
1591 1998.
- 1592 BOARO, M. Morfofisiologia do trato intestinal. In: Conferência Apinco de Ciência e  
1593 Tecnologia Avícola, 2009, Porto Alegre, RS. FACTA. 2009; 261-274.
- 1594 BONA TDMM, PICKLER L, MIGLINO LB, KURITZA LN, VASCONCELOS SP, SANTIN  
1595 E. Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de  
1596 *Salmonella*, *Eimeria* e *Clostridium* em frangos de corte. Pesquisa Veterinária Brasileira.  
1597 2012; 32: 411-418.
- 1598 BONATTI AR, MONTEIRO MCGB. Biosseguridade em granjas avícolas de matrizes.  
1599 Revista Acadêmica Digital do Grupo POLIS Educacional – ISSN. 2008;1679-8902.
- 1600 BONES AM, ROSSITER JT. The myrosinase-glucosinolate system, its organisation and  
1601 biochemistry. *Physiologia Plantarum*. 1996; 97: 194-208.
- 1602 BONI HFK, CARRIJO AS, FASCINA VB. Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e  
1603 abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. Revista  
1604 Brasileira de Saúde e Produção Animal. 2011; 12: 84-95.
- 1605 BORGES A, SIMÕES LC, SAAVEDRA MJ, SIMÕES M. The action of selected  
1606 isothiocyanates on bacterial biofilm prevention and control. *International Biodeterioration*  
1607 *e Biodegradation*. 2014; 86: 25-33.
- 1608 BOROSKY CJ. O Uso de Ácidos Orgânicos e Suas Particularidades na Produção  
1609 Animal. Engormix, 2011. Disponível em: [http://pt.engormix.com/MA-  
1610 avicultura/nutricao/artigos/acidos-organicos-t370/141-p0.htm](http://pt.engormix.com/MA-avicultura/nutricao/artigos/acidos-organicos-t370/141-p0.htm) . Acesso em (23/10/2014).
- 1611 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Instrução Normativa nº  
1612 78, de 03 de novembro de 2003 que aprova as Normas Técnicas para Controle e  
1613 Certificação de Núcleos e Estabelecimentos Avícolas como livres de *Salmonella*  
1614 *Gallinarum* e de *Salmonella Pullorum* e Livres ou Controlados para *Salmonella*  
1615 *Enteritidis* e para *Salmonella Typhimurium*. Diário Oficial da União, Brasília, 15 nov.  
1616 2003b.

- 1617 BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e do Abastecimento. Substâncias proibidas  
1618 na alimentação animal com a finalidade de aditivo e legislação correspondente. Diário  
1619 Oficial da União, Brasília, 15 nov. 2003b. IN nº 14, 17/05/2013.
- 1620 BREIER A, ZIEGELHÖFFER A. "Lysine is the Lord", though some scientists in regard to  
1621 the group interacting with fluorescein isothiocyanate in ATP-binding sites of P-type  
1622 ATPases but, is it not cysteine? A mini review. *General Physiology and Biophysics*.  
1623 2000; 19: 253-263.
- 1624 BRENES AA, ROURA E. Review: Essential oils in poultry nutrition: Main effects and  
1625 modes of action. *Animal Feed Science and Technology*. 2010; 158: 1-14.
- 1626 BURT S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods –  
1627 a review. *International Journal of Food Microbiology*. 2004; 94: 223-253.
- 1628 BURT SA, FLEDDERMAN MJ, HAAGSMAN HP, KNAPEN FV, VELDHUIZEN EJA.  
1629 Inhibition of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis on agar and raw chicken by  
1630 carvacrol vapour. *International Journal of Food Microbiology*. 2007; 119: 346-350.
- 1631 CAMPIONI F, ZOLDAN MM, FALCÃO JP. Characterization of *Salmonella* Enteritidis  
1632 strains isolated from poultry and farm environments in Brazil. *Epidemiology e Infection*.  
1633 2014; 142: 1403-1410.
- 1634 CARDOSO ALSP. *Salmonella* Enteritidis em aves e na saúde pública: revisão de  
1635 literatura. *Revista científica eletrônica de medicina veterinária*. 2013; 21: 1679-7353.
- 1636  
1637 CARSON CF, MEE BJ, RILEY TV. Mechanism of action of *melaleuca alternifolia* (tea  
1638 tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt  
1639 tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*,  
1640 June 2002; 46: 1914-1920.
- 1641 CARVALHO ACFB, CORTEZ ALL. *Salmonella* sp. Em carcaças, carne mecanicamente  
1642 separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. *Ciência Rural*. 2005; 35: 1465-1468.

- 1643 CASTILLA KS. Detecção de genes de virulência em diferentes fagotipos e ribotipos de  
1644 *Salmonella* Enteritidis utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)  
1645 (Dissertação de Mestrado). São Paulo, SP: Faculdade de Medicina Veterinária e  
1646 Zootecnia da Universidade de São Paulo; 2003.
- 1647 CEYLAN E, FUNG DYC. Antimicrobial activity of spices. *Journal of Rapid Methods and*  
1648 *Automation in Microbiology*. 2004; 12: 1-55.
- 1649 CHACON PA, BUFFO RA, HOLLEY RA. Inhibitory effects of microencapsulated allyl  
1650 isothiocyanate (AIT) against *Escherichia coli* O157:H7 in refrigerated, nitrogen packed,  
1651 finely chopped beef. *International Journal of Food Microbiology*. 2006; 107: 231-237.
- 1652 CHANG M, CHEN T. Reduction of *Campylobacter jejuni* in a simulated chicken digestive  
1653 tract by *Lactobacilli* cultures. *Journal of Food Protection*, Vol. 2000; 63: 1594-1597.
- 1654 CHAVEERACH P, KEUZENKAMP DA, LIPMAN LJA, KNAPEN FV. Effect of organic  
1655 acids in drinking water for young broilers on *Campylobacter* infection, volatile fatty acid  
1656 production, gut microflora and histological cell changes. *Poultry Science*. 2004; 83: 330-  
1657 334.
- 1658 CHEN S, ANDREASSON E. Update on glucosinolate metabolism and transport -  
1659 Review. *Plant Physiology Biochemistry*. 2001; 39: 743-758.
- 1660 COBURN B, GRASSI GA, FINLAY BB. *Salmonella*, the host and disease: A brief review.  
1661 *Immunology and Cell Biology*. 2007; 85: 112-118.
- 1662 COSTA LB, LUCIANO FB, MIYADA VS, GOIS3 FD. Herbal extracts and organic acids  
1663 as natural feed additives in pig diets. *South African Journal of Animal Science*. 2013; 43:  
1664 0375-1589.
- 1665 CRAVOTTO G, BOFFA L, GENZINI L, GARELLA D. Phytotherapeutics: an evaluation of  
1666 the potential of 1000 plants. *Journal of Clinical Pharmacy and Therapeutics*, Oxford.  
1667 2010; 35: 11-48.

- 1668 CASEWELL M, FRIIS CE, MARCO P, MCMULLIN, PHILLIPS I. The European ban on  
1669 growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health.  
1670 *Journal Antimicrobial Chemotherapy*. 2003; 52: 159-161.
- 1671 CROCOLL C, ASBACH J, NOVAK J, GERSHENZON J, DEGENHARDT J. Terpene  
1672 synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and  
1673 regulation of terpene biosynthesis. *Plant Molecular Biology*. 2010; 73: 587-603.
- 1674 DAXENBICHLER ME, SPENCER GF, CARLSON DG, ROSE GB, BRINKER AM,  
1675 POWELL RG. Glucosinolate composition of seeds from 297 species of wild plants.  
1676 *Phytochemistry*. 1991; 30: 2623-2638.
- 1677 DEGENHARDT J, KÖLLNER TG, GERSHENZON J. Monoterpene and sesquiterpene  
1678 synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants: a review.  
1679 *Phytochemistry*. 2009; 70: 1621-1637.
- 1680 DIAS GEA. Óleo essencial de orégano (*Origanum Vulgare* L.) como melhorador de  
1681 desempenho de frangos de corte. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Zootecnia) -  
1682 Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, RJ. 2011.
- 1683 DIAS C, AIRES A, SAAVEDRA MA. Antimicrobial Activity of Isothiocyanates from  
1684 Cruciferous Plants against Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA).  
1685 *International Journal of Molecular Sciences*. 2014, 15, 19552-19561.
- 1686 DIBNER JJ e RICHARDS JD. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and  
1687 mode of action. *Poultry Science*. 2005, 84: 634-643.
- 1688 DUFOUR V, ALAZZAM B, ERMEL G, THEPAUT M, ROSSERO A, TRESSE O,  
1689 BAYSSE C. Antimicrobial activities of isothiocyanates against *Campylobacter jejuni*  
1690 isolates. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2012; 2: 1-13.
- 1691 DUFOUR V, STAHL M, BAYSSE C. The antibacterial properties of isothiocyanates.  
1692 *Microbiology*. 2015; 161: 229-243.

- 1693 DUFOUR V, STAHL M, ROSENFELD E, STINTZI A, BAYSSE C. Insights into the mode  
1694 of action of benzyl isothiocyanate on *Campylobacter jejuni*. Applied and Environmental  
1695 Microbiology. 2013; 79: 6958-6968.
- 1696 EFSA 2015. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses,  
1697 zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2013; European Food Safety Authority  
1698 Journal. 2015; 13: 399.
- 1699 ENGLYST H, WIGGINS HS, CUMMINGS JH. Determination of the non-starch  
1700 polysaccharides in plant foods by gas: liquid chromatography of constituent sugars as  
1701 alditol acetates. Analyst. 1982; 107: 307-318.
- 1702 ERTAS ON, GÜLER T, ÇİFTÇİ M, DALKILIÇ B, SIMSEK ÜG. The effect of an essential  
1703 oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. International  
1704 Journal of Poultry Science. 2005; 11: 879-884.
- 1705 FAHEY JW, ZALCMANN AT, TALALAY P. The chemical diversity and distribution of  
1706 glucosinolates and isothiocyanates among plants. Phytochemistry. 2001; 56: 5-51.
- 1707 FEI LV, HAO L, QIPENG Y, LI C. In vitro antimicrobial effects and mechanism of action  
1708 of selected plant essential oil combinations against four food-related microorganisms.  
1709 Food Research International. 2011; 44; 3057-3064.
- 1710 FENGYING G, JIE G, HUI R, GUOQING H. *In vitro* evaluating the activities and  
1711 stabilities of the multihydrolases produced by *Aspergillus niger* zju-Y1 in simulated  
1712 poultry digestive tract pH levels. Procedia Engineering. 2011; 18: 405-410.
- 1713 FERNANDES BCS. Integridade intestinal e desempenho de frangos de corte  
1714 suplementados com probióticos, prebióticos e ácidos orgânicos (Dissertação de  
1715 Mestrado) Botucatu - SP. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia Câmpus De  
1716 Botucatu; 2012.
- 1717 FISHER K, PHILLIPS C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus  
1718 the answer. Trends in Food Science e Technology. 2008; 19: 156-164.

- 1719 FONSECA IP. Efeito de óleos essenciais de plantas aromáticas no comportamento de  
1720 *salmonella* spp. em salsichas frescas (Dissertação de Mestrado). Vila Real.  
1721 Universidade De Trás-Os-Montes e Alto Douro; 2012.
- 1722 FORTUNA, J. L.; FRANCO, R. M. Pequeno dossiê epidemiológico da *Salmonella*, como  
1723 causadora de infecções alimentares. Revista Higiene Alimentar. 2005; 19: 33-44.
- 1724 FOSTER WJ. When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. Current  
1725 Opinion in Microbiology. 1999; 2: 170-174.
- 1726 FRANCO LG. Ácidos orgânicos como alternativa ao uso de antimicrobiano melhorador  
1727 de desempenho em frangos de corte, (Dissertação de Mestrado) Pirassununga -SP.  
1728 Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo;  
1729 2009.
- 1730 FRESCHI JB. Ácidos orgânicos isolados ou associados em dietas de frangos de corte  
1731 (Dissertação de Mestrado) Dracena - SP. Universidade Estadual Paulista Júlio de  
1732 Mesquita Campus Experimental De Dracena; 2014.
- 1733 GAMA NMSQ, BERCHIERI JrA, FERNANDES AS. Occurrence of *Salmonella* sp in  
1734 laying hens. Revista Brasileira de Ciência Avícola. 2003; 5: 15-21.
- 1735 GAMA NMSQ, OLIVEIRA MBC, SANTIN E, BERCHIERI Â. Ácidos orgânicos em rações  
1736 de poedeiras comerciais. Ciência Rural. 2000; 30: 499-502.
- 1737 GARY E, DUKES AH. Fisiologia dos animais domésticos. In: SWENSON MJ, REECE  
1738 WO. Editor. Digestão nas aves. Cornell University Press; 1988. p. 317-323.
- 1739 GHAWI SK, METHVEN L, NIRANJAN K. The potential to intensify sulforaphane  
1740 formation in cooked broccoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) using mustard seeds  
1741 (*Sinapis Alba*). Food Chemistry. 2013; 138: 1734-1741.
- 1742 GIUBERTI G, GALLO A, MASOERO F. Plasma glucose response and glycemic indices  
1743 in pigs fed diets differing in in vitro hydrolysis indices. The Animal Consortium. 2012; 6:  
1744 1068-1076.

- 1745 GRADES ZEA. Biosynthesis of the phenolic monoterpenes, thymol and carvacrol, by  
1746 terpene synthases and cytochrome P450s in oregano and thyme (Dissertação).  
1747 Vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-  
1748 Universität Jena; 2011.
- 1749 GORIS J, DIERICK N, HERMAN L, HEYNDRICKX M, MESSENS W. Inhibition of  
1750 *Salmonella Typhimurium* by medium chain fatty acids in an in vitro simulation of the  
1751 porcine caecum. Safepork. 2007.
- 1752 GUIBOURDENCHE M, ROGGENTIN P, MIKOLEIT M, FIELDS PI, BOCKEMUHL J,  
1753 GRIMONT PAD, WEILL FX. Supplement 2003 e 2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-  
1754 Le Minor scheme. Research in Microbiology. 2010; 161: 26-29.
- 1755 GUNAL M, YAYLI G, KAYA O, KARAHAN N, SULAK O. The effects of antibiotic growth  
1756 promoter, probiotic or organic acid supplementation on performance, intestinal  
1757 microflora and tissue of broilers. International Journal of Poultry Science 2006; 5: 149-  
1758 155.
- 1759 GURTLER H, KETZ HA, SCHRODER L. Fisiologia veterinária. In: KOLB E, editor. A  
1760 fisiologia da digestão e da absorção: A digestão nas aves. 4ª edição. Rio de Janeiro:  
1761 Guanabara Koogan, 1987. p. 191-207.
- 1762 HALKIER BAH, DU L. The biosynthesis of glucosinolates. Trends in Plant Science.  
1763 1997; 2: 11.
- 1764 HALKIER BA, GERSHENZON J. Biology and Biochemistry of Glucosinolates. Annual  
1765 Review of Plant Biology. 2006; 57: 303-333.
- 1766 HANSCHEN FS, BRÜGGEMANN N, BRODEHL A, MEWIS I; SCHREINER M, ROHN K,  
1767 KROH LW. Characterization of products from the reaction of glucosinolate - Derived  
1768 isothiocyanates with cysteine and lysine derivatives Formed in either model systems or  
1769 broccoli sprouts. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2012; 60: 7735-7745.
- 1770 HARAMOTO ER, GALLANDT ER. Brassica cover cropping for weed management: A  
1771 review. Renewable Agriculture and Food Systems. 2004; 19: 187-198.

- 1772 HELANDER IM, ALAKOMI HL, LATVA-KALA K, MATTILA-SANDHOLM T, POL I, SMID  
1773 EJ, GORRIS LGM, VON WRIGHT A. Characterization of the action of selected essential  
1774 oil components on Gramnegative bacteria. Journal of Agricultural and Food Chemistry.  
1775 1998; 46: 3590-3595.
- 1776 HICKMAN-BRENNER FW, STUBBS AD, FARMER JJ. Phage typing of Salmonella  
1777 Enteritidis in the United States. Journal of clinical microbiology.1991; 2817-2823. Royal  
1778 Society of Chemistry journals. 1982; 107: 307-318.
- 1779 HONIG DH, RACKIS JJ. Determination of the total pepsin-pancreatin indigestible  
1780 content (dietary fiber) of soybean products, wheat bran, and corn bran. Journal of  
1781 Agricultural and Food Chemistry. 1979; 27: 1262-1266.
- 1782 HERMANS D, MARTEL A, VAN DEUN K, VERLINDEN M, VAN IMMERSEEL F,  
1783 GARMYN A, MESSENS W, HEYNDRICKX M, HAESEBROUCK F, PASMANS F.  
1784 Intestinal mucus protects *Campylobacter jejuni* in the ceca of colonized broiler chickens  
1785 against the bactericidal effects of medium-chain fatty acids. Poultry Science. 2010; 89:  
1786 1144-1155.
- 1787 HILMI HTA, SURAKKA A, APAJALAHTI J, SARIS PEJ. Identification of the most  
1788 abundant *Lactobacillus* species in the crop of 1- and 5-week-old broiler chickens.  
1789 Applied and Environmental Microbiology. 2007; 73: 7867-7873.
- 1790  
1791 HINTON JrA, INGRAM KD. Influence of ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) on the  
1792 ability of fatty acids to inhibit the growth of bacteria associated with poultry processing.  
1793 International Journal of Poultry Science. 2011; 10: 500-504.
- 1794 HINTON JrA, BUHR RJ, INGRAM KD. Reduction of *Salmonella* in the crop of broiler  
1795 chickens subjected to feed withdrawal. Poultry Science. 2000; 79: 1566-1570.
- 1796 HOLLEY RA, PATEL D. Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by  
1797 plant essential oils and smoke antimicrobials. Food Microbiology. 2005; 22: 273-292.
- 1798 HUME ME, DONALD E, CORKIER G, WAYNE IVIE, DELOACH JR. Metabolism of  
1799 [14C] propionic acid in broiler chicks. Poultry Science 1993; 72: 786-793.

1800

1801 HUME ME. Historic perspective: Prebiotics, probiotics, and other alternatives to  
1802 antibiotics. Poultry Science. 2011; 90: 2663–2669.

1803

1804 HUR SJ, LIM BO, DECKER EA, MCCLEMENTS DJ. In vitro human digestion models for  
1805 food applications. Food Chemistry. 2011; 125: 1-12.

1806 HUYGHEBAERT G, DUCATELLE R, IMMERSEEL FV. An update on alternatives to  
1807 antimicrobial growth promoters for broilers. The Veterinary Journal. 2011; 187: 182-188.

1808 INAMUCO J, VEENENDAAL AKJ, BURT SA, POST JA, JOHANNA LM, BOKHOVEN T,  
1809 HAAGSMAN HP, VELDHUIZEN EJA. Sub-lethal levels of carvacrol reduce *Salmonella*  
1810 Typhimurium motility and invasion of porcine epithelial cells. Veterinary Microbiology.  
1811 2012; 157: 200-207.

1812 BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Indicadores IBGE. Estatística da  
1813 Produção Pecuária. Junho de 2014. Disponível em:  
1814 [http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos\\_201404\\_publ\\_completa.pdf](http://www1.ibge.gov.br/home/estatistica/indicadores/agropecuaria/producaoagropecuaria/abate-leite-couro-ovos_201404_publ_completa.pdf). Acessado em: 11/11/2015.

1815

1816 IRINO K, FERNANDES SA, TAVECHIO AT, NEVES BC, DIAS AMG. Progression of  
1817 *Salmonella* Enteritidis phage type 4 strains in São Paulo state, Brasil. Revista do  
1818 Instituto de Medicina Tropical de São Paulo. 1996; 38: 193-196.

1819 ISSENHUTH-JEANJEAN S, ROGGENTIN P, MIKOLEIT M, GUIBOURDENCHE M.  
1820 Supplement 2008 e 2010 (No. 48) to the white e kauffmanne-le minor scheme.  
1821 Research in Microbiology. 2014; 165: 526-530.

1822 JACOB C, ANWAR A. The chemistry behind redox regulation with a focus on sulphur  
1823 redox systems: a review. Physiologia Plantarum. 2008; 133: 469-480.

1824 JACOB C, GILES GI, GILES NM, SIES H. Sulfur and selenium: the role of oxidation  
1825 state in protein structure and function: a reviews. Angewandte Chemie International  
1826 Edition. 2003; 42: 4742-4758.

- 1827 JANG M, HONG E, KIM G-H. Evaluation of antibacterial activity of 3-butenyl, 4 pentenyl,  
1828 2-phenylethyl, and benzyl isothiocyanate in *Brassica* vegetables. Journal of Food  
1829 Science. 2010; 75: 7.
- 1830 JOHNY AK, DARRE MJ, DONOGHUE AM, DONOGHUE DJ, VENKITANARAYANAN K.  
1831 Antibacterial effect of *trans*-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and thymol on  
1832 *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents in vitro.  
1833 Journal Poultry Science. 2010; 19: 237-244.
- 1834 KALEMBA D, KUNICKA A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils.  
1835 Current Medicinal Chemistry. 2003; 10: 813-829.
- 1836 KIL DY, PIAO LG, LONG HF, LIM JS, YUN MS, KONG CS, JU WS, LEE HB, KIM YY.  
1837 Effects of organic or inorganic acid supplementation on growth performance, nutrient  
1838 digestibility and white blood cell counts in weanling pigs. Journal of Animal Sciences.  
1839 2006; 19: 252-261.
- 1840 KOLM RH, DANIELSON UH, ZHANG Y, TALALAY P, MANNERVIK B. Isothiocyanates  
1841 as substrates for human glutathione transferases: structure-activity studies. Biochemical  
1842 Journal. 1995; 311: 453-459.
- 1843 KOTTWITZ LBM, SCHEFFER MC, COSTA LMD, LEÃO JA, BACK A, RODRIGUES DP,  
1844 MAGNANI M, OLIVEIRA TCRM. Perfil de resistência a antimicrobianos, fagotipagem e  
1845 caracterização molecular de cepas de *Salmonella* Enteritidis de origem avícola.  
1846 Ciências Agrárias. 2012; 33: 705-712.
- 1847 KRAUSE DA, HARRISON PC, EASTER RA. Characterization of the nutritional  
1848 interactions between organic acids and inorganic bases in the pig and chick. Journal  
1849 Animal Science. 1994; 72: 1257-1262.
- 1850 LEE KW, EVERTS H, KAPPERT HJ, FREHNER M, LOSA R, BEYNEN AC. Effects of  
1851 dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid  
1852 metabolism in female broiler chickens, British Poultry Science. 2003; 44: 450-457.

- 1853 LEE KW, EVERTS H, BEYNEN AC. Essential oils in broiler nutrition. International  
1854 Journal of Poultry Science. 2004; 12: 738-752.
- 1855 LONGO FA, SILVA IF, LAZARIN MA. A importância do controle microbiológico em  
1856 rações para aves. In: XI Simpósio Brasil Sul de Avicultura. Anais. 06 a 08 de abril de  
1857 2010, Chapecó, SC, Brasil, p. 36-63.
- 1858 LUCIANO FB. Mechanism of action and utilization of isothiocyanates from mustard  
1859 against *Escherichia Coli* o157:h7 (Thesis). Manitoba. Faculty of Graduate Studies the  
1860 University of Manitoba; 2010.
- 1861 LUCIANO FB, HOLLEY RA. Enzymatic inhibition by allyl isothiocyanate and factors  
1862 affecting its antimicrobial action against *Escherichia coli* O157:H7. International Journal  
1863 of Food Microbiology. 2009; 131: 240-245.
- 1864 LÜCKSTÄDT C, MELLOR S. The use of organic acids in animal nutrition, with special  
1865 focus on dietary potassium diformate under European and Austral-Asian conditions.  
1866 Recent Advances in Animal Nutrition. 2011; 18: 123-130.
- 1867 LUEGAS JAP, ALBINO LFT, TAVERNARI FC, BARROS VRSM, PESSOA GBS,  
1868 ROSTAGNO HS. Efeito da adição de probióticos na dieta sobre digestibilidade ileal da  
1869 matéria seca e da proteína de frangos de corte. Revista Archivos de Zootecnia. 2015;  
1870 64: 00-00.
- 1871 MACHADO JUNIOR PC, BEIRÃO BCB, FERNANDES FILHO T, LOURENÇO MC,  
1872 JOINEAU ML, SANTIN E, CARON LF. Use of blends of organic acids and oregano  
1873 extracts in feed and water of broiler chickens to control *Salmonella* Enteritidis  
1874 persistence in the crop and ceca of experimentally infected birds. Poultry Science  
1875 Association. 2014; 23: 671-682.
- 1876 MAIORKA A, SANTIN AME, BORGES SA, OPALINSKI M, SILVA AVF. Emprego de  
1877 uma mistura de ácidos fumárico, láctico, cítrico e ascórbico em dietas iniciais de frangos  
1878 de corte. Archives of Veterinary Science. 2004; 1: 31-37.

- 1879 MALATHI V, DEVEGOWDA G. In vitro evaluation of nonstarch polysaccharide  
1880 digestibility of feed ingredients by enzymes. Poultry Science. 2001; 80: 302-305.
- 1881 MANI-LÓPEZ E, H.S. GARCÍA HS, LÓPEZ-MALO A. Organic acids as antimicrobials to  
1882 control *Salmonella* in meat and poultry products. Food Research International. 2012; 45:  
1883 713-721.
- 1884 MARAMBE HK, SHAND PJ, WANASUNDARA JPD. Release of angiotensin i-converting  
1885 enzyme inhibitory peptides from flaxseed (*linum usitatissimum* L.) protein under  
1886 simulated gastrointestinal digestion. Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2011;  
1887 59: 9596-9604.
- 1888 MARTINEZ-HARO M, TAGGART MA, GREEN AJ, MATEO R. Avian digestive tract  
1889 simulation to study the effect of gritgeochemistry and food on pb shot bioaccessibility.  
1890 Environmental Science & Technology. 2009; 43: 9480-9486.
- 1891 MARTON MR, LAVRIC V. A simple method for the quantification of isothiocyanates from  
1892 mustard. Scientific Bulletin. 2013; 75: 1454-2331.
- 1893 MATHLOUTHI N, BOUZAIENNE T, OUESLATI I, RECOQUILLAY F, HAMDY M,  
1894 URDACI M, BERGAOUI R. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of  
1895 essential oils in broiler chickens: in vitro antimicrobial activities and effects on growth  
1896 performance. Journal of Animal Science. 2012; 90: 813-823.
- 1897 MEAD GC, LAMMERDING AM, COX NA, DOYLE MP, HUMBERT F, KULIKOVSKIY A,  
1898 PANIN A, NASCIMENTO VP, WIERUP M. Scientific and technical factors affecting the  
1899 setting of *Salmonella* criteria for raw poultry: a global perspective. Journal of Food  
1900 Protection. 2010; 73: 1566-90.
- 1901 MERRELL DS, CAMILLI A. Acid tolerance of gastrointestinal pathogens. Current  
1902 Opinion in Microbiology 2002; 5: 51-55.
- 1903 MESSENS W, GORIS J, DIERICK N, HERMAN L, HEYNDRIKX M. Inhibition of  
1904 *Salmonella Typhimurium* by medium-chain fatty acids in an in vitro simulation of the  
1905 porcine cecum. Veterinary Microbiology. 2010; 141: 73-80.

- 1906 MICHIELS J, MISSOTTEN J, FREMAUT D, SMET SN, DIERICK SN. *In vitro* dose-  
1907 response of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde and interaction of  
1908 combinations for the antimicrobial activity against the pig gut flora. *Livestock Science*.  
1909 2007; 109: 157-160.
- 1910 MITHEN R, BENNETT R, MARQUEZ J. Glucosinolate biochemical diversity and  
1911 innovation in the Brassicales. *Phytochemistry*. 2010; 71: 2074-2086.
- 1912 MORAES DMC, ANDRADE MA, MINAFRA-REZENDE CS, BARNABÉ ACS, JAYME  
1913 VS, NUNES IA, BATISTA DA. Fontes de infecção e perfil de suscetibilidade aos  
1914 antimicrobianos de *Salmonella* sp. isoladas no fluxo de produção de frangos de corte.  
1915 *Arquivos do Instituto Biológico*. 2014; 81: 195-201.
- 1916 MORAN ET. Comparative nutrition of fowl and swine: the gastrointestinal systems.  
1917 Ontario, Canada - University of Guelph. 1982.
- 1918 MROZ Z. Organic acids as potential alternatives to antibiotic growth promoters for pigs.  
1919 *Advances in Pork Production*. 2005; 16: 169-180.
- 1920 MUNIZ EC, PICKLER L, LOURENÇO MC, KRAIESKI AL, MESA D, WESTPHAL P,  
1921 SANTIN E. Avaliação da resposta imunológica da mucosa intestinal de frangos de corte  
1922 desafiados com diferentes sorovares de *Salmonella*. *Pesquisa Veterinária Brasileira*.  
1923 2015; 35: 241-248.
- 1924 OLAIMAT NA, HOLLEY RA. Effects of changes in ph and temperature on the inhibition  
1925 of salmonella and listeria monocytogenes by allyl isothiocyanate. *Food Control*. 2013;  
1926 34: 414-419.
- 1927 PALANIAPPAN K, HOLLEY RA. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic  
1928 susceptibility of drug resistant bacteria. *International Journal of Food Microbiology*.  
1929 2010; 140: 164-168.
- 1930 PANDINI JÁ, PINTO FGS, MULLER JM, WEBER LD, MOURA AC. Ocorrência e perfil  
1931 de resistencia antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do  
1932 Paraná, Brasil. *Arquivos do Instituto Biológico*. 2014; 20: 1-6.

- 1933 PEREIRA RJ, CARDOSO MG. Metabólitos secundários vegetais e benefícios  
1934 antioxidantes vegetable secondary metabolites and antioxidants benefits. Journal of  
1935 Biotechnology and Biodiversity. 2012; 4: 146-152.
- 1936 PERESI JTM, IVETE AZC, LIMA ASI, MARQUES DF, ELISABETE CA, RSA  
1937 FERNANDES, DILMA SG, IRINO K. Surtos de enfermidades transmitidas por alimentos  
1938 causados por *Salmonella* Enteritidis. Revista Saúde Pública. 1998; 32: 477-83.
- 1939 PICKLER L, HAYASHI RM, LOURENCO MC, MIGLINO LB, CARON LF, BEIRAO BCB,  
1940 SILVA AVF, SANTIN E. Avaliacao microbiologica, histologica e imunologica de frangos  
1941 de corte desafiados com *Salmonella* Enteritidis e Minnesota e tratados com acidos  
1942 organicos. Pesquisa Veterinária Brasileira. 2012; 32: 27-36.
- 1943 PICONE G, LAGHI L, GARDINI F, LANCIOTTI L, SIROLI L, CAPOZZI F. Evaluation of  
1944 the effect of carvacrol on the *Escherichia coli* 555 metabolome by using 1H-NMR  
1945 spectroscopy. Food Chemistry. 2013; 141: 4367-4374.
- 1946 POULOSE AJ, CROTEAU R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes conversion of  $\gamma$ -  
1947 terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. Archives Of Biochemistry And  
1948 Biophysics. 1978; 187: 307-314.
- 1949 RAVAGNANI LK, AGOSTINIS RO, OTUTUMI LK, LIMA ET, FERNANDES JIM,  
1950 MARTINS LA. Pesquisa de *Salmonella* spp. em frangos de corte criados em galpões  
1951 climatizados de uma integração na região Oeste do Paraná. Ciências Agrárias. 2012;  
1952 33: 2327-2336.
- 1953 RICKE SC. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as  
1954 antimicrobials. Poultry Science. 2003; 82: 632-639.
- 1955 GETTY DVMR. Anatomia dos animais domésticos. In SISSON/GROSSMAN, editor.  
1956 Sistema digestivo. 5ª edição. Guanabara Koogan, 1987; 1740-1761.
- 1957 SANTOS SA, MEURER RFP, FRANÇA M, MAIORKA A, OLIVEIRA EG, SILVA AVF,  
1958 BORGES SA. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo  
1959 diformiato de potássio. Ciência Rural. 2009; 39: 2491-2496.

- 1960 SCALLAN E, HOEKSTRA RM, ANGULO FJ, TAUXE RV, WIDDOWSON M-A, ROY SL.  
1961 Foodborne illness acquired in the United States-major pathogens. *Emerging Infectious*  
1962 *Diseases journal*. 2011; 17: 7-15.
- 1963 SHAN B, CAI YZ, BROOKS JD, CORKE H. The in vitro antibacterial activity of dietary  
1964 spice and medicinal herb extracts. *International Journal of Food Microbiology*. 2007;  
1965 117: 112-119.
- 1966 SIKKEMA J, BONT JAM, POOLMAN B. Mechanisms of membrane toxicity of  
1967 hydrocarbons. *American Society for Microbiology*. 1995; 59: 201-222.
- 1968 SILVA EN, DUARTE A. *Salmonella* Enteritidis em aves: Retrospectiva no Brasil. *Revista*  
1969 *Brasileira de Ciência Avícola*. 2002; 4: 085-100.
- 1970 SILVA MA, MARVULO MFV, MOTA RA, SILVA JCR. A importância da ordem  
1971 Ciconiiformes na cadeia epidemiológica de *Salmonella* spp. para a saúde pública e a  
1972 conservação da diversidade biológica. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 2010; 30: 573-  
1973 580.
- 1974 SILVA SQ, SANTOS MT, PAES AS, VANETTI MCD. Acid and low temperature  
1975 treatments on *Salmonella* Enteritidis inoculated in pork and its subsequent survival in  
1976 simulated gastric fluid. *Ciência Rural*. 2016; 46: 530-535.
- 1977 SILVA-HIDALGO G, ORTIZ-NAVARRETE VF, ALPUCHE-ARANDA CM, RENDÓN-  
1978 MALDONADO JG, LÓPEZ-VALENZUELA M, JUÁREZ-BARRANCO F, LÓPEZ-  
1979 MORENO HS. Non-typhi *Salmonella* serovars found in Mexican zoo animals. *Research*  
1980 *in Veterinary Science*, 2012; 93: 1132-1135.
- 1981 SISTEMA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (SVS). Análise epidemiológica dos surtos de  
1982 doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2008. Disponível em:  
1983 <[portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos\\_dta\\_15.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos_dta_15.pdf)>. Acesso em: 25/08/2015.
- 1984 SØNDERBY ID, GEU-FLORES F, HALKIER BA. Biosynthesis of glucosinolates – gene  
1985 discovery and beyond. *Trends in Plant Science*. 2010; 15: 5.

- 1986 SOUSA E. Infecção experimental em frangos de corte com sorotipos de *Salmonella*  
1987 spp. isolados de instalações avícolas e da avifauna selvagem, (Tese de Doutorado).  
1988 Jaboticabal, SP: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e  
1989 Veterinárias; 2012.
- 1990 STEPHENSON DP, MOORE RJ, ALLISON GE. *Lactobacillus* strain ecology and  
1991 persistence within broiler chickens fed different diets: Identification of persistent strains.  
1992 Applied and Environmental Microbiology. 2010; 76: 6494-6503.
- 1993 STANLEY K, JONES K. Cattle and sheep farms as reservoirs of *Campylobacter*. Journal  
1994 of Applied Microbiology. 2003; 94: 104-113.
- 1995 STERZO EV, PAIVA JB, MESQUITA AL, FREITAS NETO OC, BERCHIERI AJr.  
1996 Organic acids and/or compound with defined microorganisms to control *Salmonella*  
1997 enterica serovar Enteritidis experimental infection in chickens. Brazilian Journal of  
1998 Poultry Science. 2007; 1: 69-73.
- 1999 SURYANARAYANA MVAN, SURESH J, RAJASEKHAR MV. Organic acids in swine  
2000 feeding - A Review. Agricultural Science Research Journals. 2012; 2: 523-533.
- 2001 TESSARI ENC, CARDOSO ALSP, KANASHIRO AMI, STOPPA GFZ, LUCIANO RL,  
2002 CASTRO AGM. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente  
2003 processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil.  
2004 Ciência Rural. 2008; 38: 2557-2560.
- 2005 THOLL D. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of  
2006 terpene metabolism. Current Opinion in Plant Biology. 2006; 9: 297-304.
- 2007 THRELFALL EJ, HAMPTON MD, CHART H, ROWE B. Use of plasmid profile typing for  
2008 surveillance of *Salmonella* Enteritidis phage type 4 from humans, poultry and eggs.  
2009 Epidemiology and Infection. 1994; 112: 25 - 31.
- 2010 THRELFALL EJ, WAIN J, PETERS T, LANE C, PINNA E, LITTLE CL, WALES AD,  
2011 DAVIES RH. Egg-borne infections of humans with salmonella: not only an S. Enteritidis  
2012 problem. World's Poultry Science Journal. 2014; 70: 25.

2013 TIIHONEN K, KETTUNEN H, BENTO MHL, SAARINEN M, LAHTINEN S, OUWEHAND  
2014 AC, SCHULZE H, RAUTONEN N. The effect of feeding essential oils on broiler  
2015 performance and gut microbiota. *British Poultry Science*. 2010; 51: 381-392.

2016 TINDALL BJ, GRIMONT AD, GARRITY MG, EUZEBY JP. Nomenclature and taxonomy  
2017 of the genus *Salmonella*. *International Journal of Systematic and Evolutionary*  
2018 *Microbiology*. 2005; 55: 521-524.

2019 TURGIS M, HAN J, CAILLET S, LACROIX M. Antimicrobial activity of mustard essential  
2020 oil against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella typhi*. *Food Control*. 2009; 20:  
2021 1073-1079.

2022 ULTEE A, BENNIK MHJ, MOEZELAAR R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is  
2023 essential for action against the foodborne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and*  
2024 *Environmental Microbiology*. 2002; 68: 1561-1568.

2025 ULTEE A, KETS EPW, ALBERDA M, HOEKSTRA FA, SMID EJ. Adaptation of the food-  
2026 borne pathogen *Bacillus cereus* to carvacrol. *Archives of Microbiology*. 2000; 174: 233-  
2027 238.

2028 ULTEE A, KETS EPW, SMID EJ. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne  
2029 pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and Environmental Microbiology*. 1999; 65: 4606-  
2030 4610.

2031 VAN IMMERSEEL F, BUCK J, PASMANS F, VELGE P, BOTTREAU E, FIEVEZ V,  
2032 HAESBROUCK F, DUCATELLE R. Invasion of *Salmonella* Enteritidis in avian  
2033 intestinal epithelial cells in vitro is influenced by short-chain fatty acids. *International*  
2034 *Journal of Food Microbiology*. 2003; 85: 237-248.

2035  
2036 VAN IMMERSEEL F, BUCK J, BOYEN F, BOHEZ L, PASMANS F, VOLF J, SEVCIK M,  
2037 RYCHLIK I, HAESBROUCK F, DUCATELLE R. Medium-chain fatty acids decrease  
2038 colonization and invasion through *hilA* suppression shortly after infection of chickens  
2039 with *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Applied and Environmental Microbiology*.  
2040 2004; 70: 3582-3587.

2041 VAN IMMERSEEL F, RUSSELL JB, FLYTHE MD, GANTOIS I, TIMBERMONT L,  
2042 PASMANS F, HAESEBROUCK F, DUCATELLE R. The use of organic acids to combat  
2043 *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy, Avian Pathology. 2006;  
2044 35: 182-188.

2045 VAN IMMERSEEL F. BOYEN F, GANTOIS I, TIMBERMONT L, BOHEZ L, PASMANS  
2046 F, HAESEBROUCK F. DUCATELLE R. Supplementation of coated butyric acid in the  
2047 feed reduces colonization and shedding of *Salmonella* in poultry. Poultry Science. 2005;  
2048 84: 1851-1856.

2049 VAN IMMERSEEL F, ROOD JI, MOORE RJ, TITBALL RW. Rethinking our  
2050 understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. Trends Microbiology.  
2051 2008; 17: 32-36.

2052 VAZ AN, ARMANDO AP, RIBEIRO AR, ZANCAN FT, BRISOLA ML. Survey of  
2053 *Salmonella* in curassows breeding center of wild animals. Ciência Animal Brasileira.  
2054 2015; 16: 68-72.

2055 VERSANTVOORT CHM, OOMEN AG, VAN DE KAMP E, ROMPELBERG CJM, SIPS  
2056 AJAM. Applicability of an in vitro digestion model in assessing the bioaccessibility of  
2057 mycotoxins from food. Food and Chemical Toxicology. 2005; 43: 31-40.

2058 VIG AP, RAMPAL G, THIND TS, ARORA S. Bio-protective effects of glucosinolates - A  
2059 review. Food Science and Technology. 2009; 42: 1561-1572.

2060 VILAS BOAS ADC. Suplementação de ácidos orgânicos em dietas para leitões na fase  
2061 de creche (Dissertação de Mestrado) Nova Odessa - SP. Instituto de Zootecnia  
2062 Programa de Pós-Graduação em Produção Animal Sustentável; 2014.

2063 VIOLA ES. Uso de acidificantes em dietas de frangos de corte: resíduos no trato  
2064 digestivo e efeitos sobre o desempenho animal e morfologia intestinal (Tese de  
2065 Doutorado) Porto Alegre - RS. Universidade Federal do Rio Grande do Sul Faculdade  
2066 de Agronomia Programa de Pós-Graduação em Zootecnia; 2006.

- 2067 VIOLA ES, VIEIRA SL. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em  
2068 dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. Revista  
2069 Brasileira de Zootecnia. 2007; 36: 1097-1104.
- 2070 VAN SOEST, PJ. Nonnutritive residues: A system of analysis for the replacement of  
2071 crude fiber. Journal - Association of Official Analytical Chemists. 1966; 49-546.
- 2072 WALI NA, BEAL J. Survival of *Lactobacillus salivarius* ncimb 41606 an *in vitro* model of  
2073 the chicken digestive process and its effect on the survival of *Salmonella* Typhimurium  
2074 nalr sall344. International Journal of Probiotics and Prebiotics. 2011; 6: 00-00.
- 2075 WALK C, BEDFORD M, McELROY P. Influence of diet, phytase, and incubation time on  
2076 calcium and phosphorus solubility in the gastric and small intestinal phase of an *in vitro*  
2077 digestion assay. American Society of Animal Science, 2015; 90: 3120-3125.
- 2078 WEURDING RE, VELDMAN A, VEEN WAG, VAN DER AAR PJ, VERSTEGEN MWA.  
2079 Starch digestion rate in the small intestine of broiler chickens differs among feedstuffs.  
2080 The Journal of Nutrition. 2001; 131: 2329-2335.
- 2081 WILSON AE, BERGAENTZLÉ M, BINDLER F, MARCHIONI E, LINTZ A, ENNAHAR S.  
2082 *In vitro* efficacies of various isothiocyanates from cruciferous vegetables as antimicrobial  
2083 agents against foodborne pathogens and spoilage bacteria. Food Control. 2013; 30:  
2084 318-324.
- 2085 WINDISCH W, SCHEDLE K, PLITZNER C, KROISMAYR A. Use of phytochemical products  
2086 as feed additives for swine and poultry. Journal Animal Science. 2008; 86: 140-148.
- 2087 YABAR E, PEDRESCHI R, CHIRINOS R, CAMPOS D. Glucosinolate content and  
2088 myrosinase activity evolution in three maca (*Lepidium meyenii* Walp.) ecotypes during  
2089 preharvest, harvest and postharvest drying. Food Chemistry. 2011; 127: 1576-1583.
- 2090 YOON H, PARK B, OH M, CHOI KH, YOON Y. Effect of NaCl on heat resistance,  
2091 antibiotic susceptibility, and Caco-2 cell invasion of *Salmonella*. BioMed Research  
2092 International. 2013; 5.

- 2093 ZHANG Y. Cancer-preventive isothiocyanates: measurement of human exposure and  
2094 mechanism of action. *Mutation Research*. 2004; 555: 173-190.
- 2095 ZHANG Y. The molecular basis that unifies the metabolism, cellular uptake and  
2096 chemopreventive activities of dietary isothiocyanates: a review. *Carcinogenesis*. 2012;  
2097 33: 2-9.
- 2098 ZYGMUNT B, BANEL A. Formation, Occurrence and determination of volatile fatty acids  
2099 an environmental and related samples. *Word Scientific and Engineering*. 2009; 476-481.