**Universidade de São Paulo
Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”**

Atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais sobre micro-organismos patogênicos e probióticos de ocorrência no trato gastrointestinal de suínos e aves destinados à produção de alimentos de origem animal

Carmen Milagros Sinche Ambrosio

Dissertação apresentada para obtenção do título de
Mestra em Ciências. Área de concentração: Ciência
e Tecnologia de Alimentos

**Piracicaba
2015**

Carmen Milagros Sinche Ambrosio
Engenheira em Industrias Alimentarias

Atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais sobre micro-organismos patogênicos e probióticos de ocorrência no trato gastrointestinal de suínos e aves destinados à produção de alimentos de origem animal

Orientador:
Prof. Dr. **SEVERINO MATIAS DE ALENCAR**

Dissertação apresentada para obtenção
do título de Mestra em Ciências. Área de
concentração: Ciência e Tecnologia de Alimentos

Piracicaba
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
DIVISÃO DE BIBLIOTECA - DIBD/ESALQ/USP

Sinche Ambrosio, Carmen Milagros

Atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais sobre microorganismos patogênicos e probióticos de ocorrência no trato gastrointestinal de suínos e aves destinados à produção de alimentos de origem animal / Carmen Milagros Sinche Ambrosio. - - Piracicaba, 2015.

133 p. : il.

Dissertação (Mestrado) - - Escola Superior de Agricultura "Luiz de Queiroz".

1. Óleos essenciais 2. Atividade antibacteriana seletiva 3. Bactérias probióticas
4. Bactérias patogênicas 5. Suínos e aves I. Título

CDD 664.3
S615a

"Permitida a cópia total ou parcial deste documento, desde que citada a fonte – O autor"

DEDICATORIA

A Dios por sobre todo.

A mis adorados padres Lorenzo Marcos Sinche Coronación y Miryam Margarita Ambrosio Jiménez (†), y a mis queridos hermanos Angely y Marco.

A mi Profesor y amigo Dr. Eduardo Micotti da Gloria.

A mis amigos y familiares en general.

AGRADECIMENTOS

Primeramente, agradezco a Dios por todas las bendiciones que recibo día a día de sus manos, por la fortaleza y guía para seguir logrando mis metas.

A mis queridos padres, Marcos y Myriam, y a mis hermanos Angy y Marquito, porque todo lo logrado hasta hoy es por ellos.

Al Prof. Dr. Severino Matías de Alencar por la orientación y apoyo durante mis estudios de Maestría y para la realización de ésta disertación.

Asimismo, un agradecimiento muy especial al Prof. Dr. Eduardo Micotti da Gloria por la confianza, el apoyo, los consejos, la paciencia, la motivación y la gran asesoría en mis estudios de Maestría y en el desarrollo de mi investigación, además del apoyo financiero proporcionado por el Laboratorio de Micotóxicas y Micotoxicosis -LAN/ESALQ, que él dirige, para la ejecución de mi investigación. Le agradezco también por la amistad y las sabías enseñanzas transmitidas a mi persona.

Al Programa Nacional de Becas y Crédito Educativo “PRONABEC” - PERÚ, por la beca concedida para realizar mis estudios de maestría y por el financiamiento para participar con mi investigación en eventos internacionales científicos.

Al Prof. Dr. Ernani Porto (Q.E.P.D) por las facilidades prestadas para hacer uso del Laboratorio de Lactinios-LAN/ESALQ, donde desarrolle la parte experimental de mi investigación. De la misma manera, al personal que labora en este laboratorio: Sra. Denisse Leme por su paciencia y enseñanza del funcionamiento de laboratorio, Dra. Nathalia Cirone por sus consejos y aclarar mis dudas, a Marjori Xavier, Bruno Galli, Melina Cruzado, Giovana Barancelli por el compañerismo.

También, hago extensivo mis agradecimientos a la Profa. Dra. Carmen Josefina Contreras Castillo por las facilidades para utilizar los equipos del Laboratorio de Carnes. Asimismo, al personal y estudiantes que laboran en este laboratorio: Dr. Marcio Pampa de Almeida por todo su apoyo y colaboración, a Srta. Mariana Saca por las facilidades prestadas, a Erick, Juan Sebastián y Juan Dario por la amistad y el compañerismo.

Al Dr. Guilherme Martin del Laboratorio de Frutas y Hortalizas - LAN, por enseñarme a ejecutar las metodologías de análisis microbiológicos utilizadas durante el desarrollo de mi investigación.

Agradezco al todo el personal del Laboratorio de Micotoxinas y Micotoxicosis por la amistad y el apoyo: a Sra. Ivani Velarini, Prof. Maria Antonia Calori, a Bianca, Luis, Jéssica, Isabela, Yemina y Alana.

Quiero agradecer también al Prof. Dr. Anderson De Souza Sant’Ana y al Prof. Dr. Ricardo Luiz Moro de Sousa por su gran conocimiento y contribución en mis estudios y en mi investigación.

Dela misma forma, agradezco al Prof. Dr. Pedro Esteves Duarte Augusto por la constante motivación.

A mi madrina Nevi Manuel Jineméz y a mis tíos Edgardo, Nancy, Meri, Eulogio; Wilder, Esmeralda y Lina, por el apoyo moral, cariño y motivación en mis estudios

Mi especial agradecimiento a mis amigos y compañeros de la maestría: Melina Cruzado, Yemina Diaz, Meliza Rojas, Claudio Miani, Erick Saldaña, Juan Dario Rios y Rafael Vela, por la bonita mistad que nos une, por los momentos compartidos y el apoyo incondicional de cada uno.

SUMARIO

RESUMO.....	9
ABSTRACT.....	11
RESUMEN.....	13
LISTA DE FIGURAS.....	15
LISTA DE TABELAS.....	17
1 INTRODUÇÃO GERAL.....	19
1.1 Revisão bibliográfica.....	23
1.1.1. Antimicrobianos promotores de crescimento.....	23
1.1.2. Óleos essenciais.....	26
1.1.3. Microbiota gastrointestinal das aves e suínos.....	27
Referencias.....	39
2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM MICRO-ORGANISMOS PATOGENICOS E PROBIÓTICOS DE OCORRÊNCIA NO TRATO GASTROINTESTINAL DE SUÍNOS E AVES	
Resumo.....	37
Abstract.....	38
Resumen.....	39
2.1 Introdução.....	40
2.2 Material e Métodos.....	41
2.3 Resultados.....	47
2.4 Discussão.....	60
2.5 Conclusão.....	67
Referencias.....	67
3 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA <i>IN VITRO</i> DE UM ÓLEO ESSENCIAL CITRÍCO E DE UMA MISTURA BINARIA DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE <i>Enterococcus faecalis</i> E <i>Lactobacillus rhamnosus</i> .	
Resumo.....	77
Abstract.....	78
Resumen.....	79
3.1 Introdução.....	80
3.2 Material e Métodos.....	82

3.3 Resultados.....	85
3.4 Discussão.....	94
3.5 Conclusão.....	98
Referencias.....	98
4 EFEITO ANTIBACTERIANO INDIVIDUAL E COMBINADO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Eucalyptus globulus</i> E <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i> SOBRE <i>Enterococcus faecalis</i> E <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	
Resumo.....	103
Abstract.....	104
Resumen.....	105
4.1 Introdução.....	106
4.2 Material e Métodos.....	107
4.3 Resultados.....	113
4.4 Discussão.....	123
4.5 Conclusão.....	126
Referencias.....	127
5 CONCLUSÕES GERAIS.....	129
6 SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS.....	133

RESUMO

Atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais sobre micro-organismos patogênicos e probióticos de ocorrência no trato gastrointestinal de suínos e aves destinados à produção de alimentos de origem animal

Os antibióticos têm sido utilizados como aditivos na alimentação animal para aumentar o desempenho e manter a saúde dos animais, como suínos e frangos, destinadas à produção de alimentos de origem animal. No entanto, desde 2006, a Comunidade Europeia proibiu o uso de antibióticos para esse propósito devido ao desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos. Como resultado, várias alternativas foram estudadas e propostas para substituir os antibióticos utilizados na alimentação animal. Os óleos essenciais têm recebido considerável atenção devido às suas propriedades antimicrobianas. Portanto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana dos óleos essenciais contra a microbiota patogênica e probiótica de ocorrência no trato gastrointestinal de suínos e aves, destinadas à produção de alimentos de origem animal. A atividade antibacteriana seletiva, a qual, significou uma alta atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas e reduzida ou nenhuma atividade sobre bactérias probióticas, foi avaliada como característica fundamental dos óleos essenciais com alto desempenho. Esta característica foi avaliada nos óleos essenciais usados individualmente e em combinações binárias. Inicialmente, no Capítulo 2, uma triagem de vinte e oito óleos essenciais (OEs) através do método de difusão em disco mostrou que *Eucalyptus globulus*, *E. exserta*, *Pimenta pseudocaryophyllus*, Orange Oil Phase Essence, e Citrus Terpens (Os dois últimos OEs foram subprodutos do processamento da laranja para obtenção de suco) tiveram uma atividade antibacteriana seletiva sobre a bactéria patogênica *Salmonella* Enteritidis e a bactéria probiótica *Lactobacillus plantarum*. Numa fase posterior, esses cinco óleos foram avaliados individualmente e em misturas binárias, contra cinco bactérias patogênicas e três bactérias probióticas. Os melhores resultados foram observados quando os OEs foram avaliados isoladamente e não em misturas. Assim, Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpens destacaram-se por ter a melhor atividade antibacteriana seletiva contra essas bactérias. No Capítulo 3, uma análise mais detalhada da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi realizada utilizando Orange Oil Phase Essence e a mistura composta pelos óleos de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus*. Estes dois óleos foram selecionados com base nos resultados do Capítulo 2 e da disponibilidade de OEs em nosso estoque. Ambos, óleo e a mistura foram avaliados sobre a bactéria patogênica mais resistente, *E. faecalis*, e a bactéria probiótica menos resistente *L. rhamnosus*, como observado no Capítulo 2. A avaliação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima do Orange Oil Phase Essence e da mistura mostrou que não tiveram um efeito antibacteriano seletivo sobre *E. faecalis* e *L. rhamnosus*. Finalmente, no Capítulo 4, foi avaliada a atividade antibacteriana individual e combinada dos óleos de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* sobre *E. faecalis* e *L. rhamnosus*. Os resultados mostraram que a combinação destes dois OEs, avaliadas pelo método checkerboard, não potencializou a atividade antibacteriana seletiva dos dois OEs. Portanto, observou-se que o óleo de *E. globulus* isoladamente apresentou a melhor atividade antibacteriana seletiva contra *E. faecalis* e *L. rhamnosus*. Em conclusão, este trabalho permitiu identificar óleos essenciais com perfil antibacteriano

seletivo para eles serem possíveis alternativas botânicas aos antibióticos utilizados na alimentação animal.

Palavras-chave: Óleos essenciais; Atividade antibacteriana seletiva; Bactérias probióticas; Bactérias patogênicas; Suínos e aves

ABSTRACT

***In vitro* antibacterial activity of essential oils against pathogenic and probiotic microorganisms of occurrence in the gastrointestinal tract of pigs and poultry intended for the food production of animal origin**

Antibiotics have been used in animal feed to maintain health and increase performance, as in the case of pigs and poultry intended for food production of animal origin. However, since 2006 the European Community has banned the use of antibiotics for this purpose due to the emergence and increase of antibiotic-resistant bacteria. As a result, several alternatives have been studied and proposed to substitute antibiotics used in animal feed. Essential oils have received considerable attention due to their antimicrobial properties. Therefore, the objective of this work was to evaluate *in vitro* the antibacterial activity of essential oils against pathogenic and probiotic bacteria that occur in the gastrointestinal tract of swine and poultry, intended for food production of animal origin. The selective antibacterial activity, which means high antibacterial activity on pathogenic bacteria and reduced or no activity on probiotic bacteria, was evaluated as a fundamental feature of the highest-performance essential oils. This feature was evaluated in essential oils used individually and in binary combinations. Initially, in Chapter 2, the screening of twenty-eight essential oils (EOs) by disk diffusion method showed that *Eucalyptus globulus*, *E. exserta*, *Pimenta pseudocaryophyllus*, Orange Oil Phase Essence, and Citrus Terpens (the last two EOs were by-products of orange juice production) had a selective antibacterial activity against the pathogenic *Salmonella* Enteritidis and probiotic *Lactobacillus plantarum*. At a later stage those five oils were evaluated, individually and in binary blends, against five pathogenic bacteria and three probiotic bacteria. Better results were observed when the EOs were checked alone and not in blends. Orange Oil Phase Essence and Citrus Terpens stood out for having the two best selective antibacterial activities against those bacteria. In Chapter 3, a more detailed analysis of essential oil antibacterial activities was performed using Orange Oil Phase Essence and the blend composed of *E. globulus* and *P. pseudocaryophyllus*. These two oils were selected based on the results of Chapter 2 and from the availability of our EO stock. Both oil and blend were checked on the most resistant pathogenic bacterium, *E. faecalis*, and on the less resistant probiotic bacterium of the *Lactobacillus* genus, *L. rhamnosus*, as observed in Chapter 2. The evaluation of Minimal Inhibitory Concentration and Minimal Bactericidal Concentration for Orange Oil Phase Essence and the blend showed that there was not a selective antibacterial effect against *E. faecalis* and *L. rhamnosus*. Finally, in Chapter 4, the individual and combined antibacterial activities of *E. globulus* and *P. pseudocaryophyllus* essential oils on *E. faecalis* and *L. rhamnosus* were evaluated. The results showed that the combination of two EOs evaluated by checkerboard method did not potentiate the selective antibacterial activity of the two EOs. Therefore, it was observed that the *E. globulus* essential oil alone had the best selective antibacterial activity against *E. faecalis* and *L. rhamnosus*. In conclusion, this work enabled the identification of essential oils with selective antibacterial profile that can become possible botanical alternatives to antibiotics used in animal feed.

Keywords: Essential oils; Selective antibacterial activity; Probiotic bacteria; Pathogenic bacteria; Pigs and poultry

RESUMEN

Actividad antibacteriana *in vitro* de aceites esenciales sobre microorganismos patógenos y probióticos de ocurrencia en el tracto gastrointestinal de cerdos y aves destinados a la producción de alimentos de origen animal

Los antibióticos son utilizados en la alimentación animal para aumentar el rendimiento y preservar la salud de los animales, como cerdos y aves destinadas a la producción de alimentos de origen animal. Sin embargo, desde 2006, la Comunidad Europea ha prohibido el uso de antibióticos para este fin, debido a la aparición y el consecuente aumento de la resistencia bacteriana a los antibióticos. Debido a esto, se han propuesto y estudiado varias alternativas para sustituir a los antibióticos utilizados en la alimentación animal, siendo los aceites esenciales los que mayor atención han recibido por sus propiedades antimicrobianas. Por tanto, el objetivo de este trabajo fue evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana *in vitro* de los aceites esenciales contra la microbiota patógena y probiótica de ocurrencia en el tracto gastrointestinal de cerdos y aves de corral destinadas a la producción de alimentos de origen animal. La actividad antibacteriana selectiva se evaluó como característica fundamental de los aceites esenciales con mejor desempeño: mayor actividad antibacteriana sobre las bacterias patógenas y menor o no actividad sobre las bacterias probióticas. Esta característica se evaluó en los aceites esenciales probados individualmente y en combinaciones. Inicialmente, en el Capítulo 2 la evaluación de veintiocho aceites esenciales (AEs) por el método de difusión en disco mostró que *Eucalyptus globulus*, *E. exserta*, *Pimenta pseudocaryophyllus*, Orange Oil Phase Essence, y Citrus Terpens (estos dos últimos AEs fueron subproductos del procesamiento de la naranja para obtención de zumo) tuvieron una actividad antibacteriana selectiva contra *Salmonella* Enteritidis y *Lactobacillus plantarum*. En un estudio del efecto antibacteriano individual y combinado (en mezclas binarias) de estos cinco AEs contra un panel de cinco bacterias patógenas y tres bacterias probióticas, se observó que la mejor actividad antibacteriana selectiva fue exhibida cuando AEs actuaban individualmente que en combinación. Por lo tanto, Orange Oil Phase Essence y Citrus Terpens se destacaron por tener la mejor actividad antibacteriana selectiva contra este panel bacterias. En el Capítulo 3, un análisis más detallado de la actividad antibacteriana de los aceites esenciales se realizó usando Orange Oil Phase Essence y la mezcla constituida por los aceites de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus*. Estos dos aceites fueron seleccionados en base a los resultados del Capítulo 2 y del saldo disoluble de los AEs. Ambos, el aceite y la mezcla, fueron probados contra la bacteria patógena más resistente, *E. faecalis*, y la bacteria probiótica menos resistente *L. rhamnosus* observados en el Capítulo 2. Orange Oil Phase Essence y la mezcla no mostraron un efecto antibacteriano selectivo contra *E. faecalis* y *L. rhamnosus*, en función de la evaluación de la Concentración Inhibitoria Mínima y Concentración Bactericida Mínima. Finalmente, en el Capítulo 4 se evaluó la actividad antibacteriana individual y combinado de los aceites esenciales de *E. globulus* y *P. pseudocaryophyllus* sobre *E. faecalis* y *L. rhamnosus*. Los resultados mostraron que la combinación de los dos AEs, evaluados por el método de Checkerboard, no potenció la actividad antibacteriana selectiva de los dos AEs. Por lo tanto, se observó que el aceite de *E. globulus* individual tuvo la mejor actividad antibacteriana selectiva contra *E. faecalis* y *L. rhamnosus*. En conclusión, este trabajo

permitió identificar los aceites esenciales con perfil antibacteriano selectivo e sean posibles alternativas botánicos a los antibióticos utilizados en la alimentación animal.

Palabras claves: Aceites esenciales; Actividad antibacteriana selectiva: Bacterias probióticas; Bacterias patógenas; Cerdos y aves de corral

LISTA DE FIGURAS

- Figura 2.1 - (A) Análises de componentes principais e (B) Análises de agrupamento hierárquico dos óleos essenciais em função de sua atividade antibacteriana sobre *Salmonella* Enteritidis e *Lactobacillus plantarum*.....50
- Figura 2.2 - Isobogramas do perfil da interação das misturas de óleos essenciais sobre bactérias patogênicas e probióticas.....59
- Figura 3.1 - Arranjo da microplaca (teste de microdiluição) para testar a atividade antibacteriana do Orange Oil Phase Essence e da mistura *E. globulus* + *P. pseudocaryophyllus*.....84
- Figura 3.2 - (A) Curva de crescimento normal do *E. faecalis*, (B) Curvas de crescimento da *E. faecalis* submetida às concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência da *E. faecalis* submetida a oito doses do Orange Oil Phase Essence.....87
- Figura 3.3 - (A) Curva de crescimento normal do *L. rhamnosus*, (B) Curvas de crescimento do *L. rhamnosus* submetido às concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do *L. rhamnosus* submetido a oito doses do óleo essencial Orange Oil Phase Essence.....88
- Figura 3.4 - (A) Curva de crescimento normal do *E. faecalis*, (B) Curvas de crescimento do *E. faecalis* submetido às concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do *E. faecalis* submetido a oito doses da mistura *E. globulus* + *P. pseudocaryophyllus*.....89
- Figura 3.5 - Curva de crescimento normal do *L. rhamnosus*, (B) Curvas de crescimento do *L. rhamnosus* submetido às concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do *L. rhamnosus* submetido a oito doses da mistura *E. globulus* + *P. pseudocaryophyllus*.....90
- Figura 3.6 - Teste de resazurina (A) *E. faecalis* submetido às concentrações do Orange Oil Phase Essence, (B) *E. faecalis* submetida às concentrações da mistura (*E. globulus* + *P. pseudocaryophyllus*), (C) *L. rhamnosus*

	submetido às concentrações do Orange Oil Phase Essence, (D) <i>L. rhamnosus</i> submetido às concentrações da mistura (<i>E. globulus</i> + <i>P. pseudocaryophyllus</i>).....	92
Figura 4.1 -	Arranjo da microplaca pelo método de checkerboard para avaliar o efeito antibacteriano da combinação dos óleos de <i>E. globulus</i> e <i>P. pseudocaryophyllus</i>	111
Figura 4.2 -	(A) Curva de crescimento normal do <i>E. faecalis</i> , (B) Curvas de crescimento do <i>E. faecalis</i> submetido a concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do <i>E. faecalis</i> a oito doses do óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i>	115
Figura 4.3 -	(A) Curva de crescimento normal do <i>L. rhamnosus</i> , (B) Curvas de crescimento do <i>L. rhamnosus</i> submetido a concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do <i>L. rhamnosus</i> a oito doses do óleo essencial de <i>Eucalyptus globulus</i>	116
Figura 4.4 -	(A) Curva de crescimento normal do <i>E. faecalis</i> , (B) Curvas de crescimento do <i>E. faecalis</i> submetido a concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do <i>E. faecalis</i> a oito doses do óleo essencial de <i>P. pseudocaryophyllus</i>	117
Figura 4.5 -	(A) Curva de crescimento normal do <i>L. rhamnosus</i> , (B) Curvas de crescimento do <i>L. rhamnosus</i> submetido a concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do <i>L. rhamnosus</i> a oito doses do óleo essencial de <i>P. pseudocaryophyllus</i>	118
Figura 4.6 -	Análises de Time Kill (tempo de morte) do <i>E. faecalis</i> e <i>L. rhamnosus</i> à CIM (14,80 mg/mL) do óleo essencial de <i>E. globulus</i> (—●—); Controle de crescimento bacteriano normal (—●—).....	121
Figura 4.7 -	Tolerância do <i>E. faecalis</i> e <i>L. rhamnosus</i> a doses sequenciais (—●—) do óleo de <i>E. globulus</i> , em comparação à tolerância a uma única doses (—●—). Controle de crescimento bacteriano: doses sequenciais (—●—) e doses única (—●—).....	122

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1 - Mecanismos de ação dos aditivos nutricionais antimicrobianos- aspectos microbiológicos.....	23
Tabela 2.1 - Micro-organismos utilizadas no experimento para extração dos óleos essenciais.....	42
Tabela 2.2 - Espécies bacterianas utilizadas no experimento.....	43
Tabela 2.3 - Atividade antimicrobiana de 28 aceites essenciais sobre a bactéria patogena <i>Samonella</i> Enteritidis e sobre a bactéria probiótica <i>Lactobacillus plantarum</i>	49
Tabela 2.4 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais selecionados e suas misturas binarias sobre bactérias patogênicas e bactérias probióticas.....	54
Tabela 2.5 - Composição química dos dois melhores óleos essenciais.....	57
Tabela 2.6 - Efeito inibitório das misturas binarias dos óleos essenciais sobre bactérias patogênicas e probióticas.....	58
Tabela 3.1 - Atividade antibacteriana do Orange Oil Phase Essence e da mistura <i>E. globulus</i> + <i>P. pseudocaryophyllus</i> sobre <i>E. faecalis</i> e <i>L. rhamnosus</i>	91
Tabela 3.2 - Composição química dos óleos essenciais de <i>Eucalyptus globulus</i> e <i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	93
Tabela 4.1 - Atividade antibacteriana do óleo de <i>E. globulus</i> e <i>P. pseudocaryophyllus</i> sobre <i>E. faecalis</i> e <i>L. rhamnosus</i>	113
Tabela 4.2 - Índice da concentração inibitória fraccionada (CIFI) das combinação do <i>E. globulus</i> e <i>P. pseudocaryophyllus</i> sobre <i>E. faecalis</i> e <i>L. rhamnosus</i>	120

1 INTRODUÇÃO GERAL

O aumento populacional tem levado a uma demanda de alimentos cada vez maior, sendo a carne um dos alimentos mais procurados e consumidos no mundo, destacando-se a carne suína e de frango por apresentarem a maior demanda e consumo (FAO, 2014). O uso de antibióticos melhoradores do desempenho na avicultura e suinocultura é frequente desde o início da década de 1950 (CROMWELL, 1991), como um método para intensificar a produção animal, contribuindo assim enormemente à rentabilidade da indústria agropecuária intensiva (HUYGHEBAERT, DUCATELLE, VAN INMMERSSEEL, 2011; TEILLANT, BROWER, LAXMINARAYAN, 2015).

Os antibióticos melhoradores do desempenho são utilizados em baixas concentrações na alimentação animal como agentes antimicrobianos para garantir o bom estado de saúde e promover o crescimento dos animais, obtendo melhoras no desempenho animal e na redução da mortalidade por doenças entéricas subclínicas (GUARDABASSI, KRUSE, 2008; BRENES, ROURA, 2010) causadas por bactérias que colonizam o trato gastrointestinal dos animais, as quais, estão presentes nas diferentes faixas etárias (BURCH, DURAN, AARESTRUP, 2008; LÖHREN, et al., 2008; MENIN et al., 2008). Assim, por exemplo, na avicultura, a *Salmonella* é o gênero bacteriano de maior preocupação por ser a principal causa de surtos de Salmonelose paratifo aviária (SPINOSA; NETO; GÓRNIK, 2005) e na suinocultura, *Escherichia coli* causa preocupação por ser o agente causal de diarreia pós-desmame (FAIRBROTHER; NADEU; GYLES, 2005), doença que produz aproximadamente 30% das perdas econômicas neste setor (BURCH; DURAN; AARESTRUP, 2008).

O uso constante dos antibióticos na alimentação animal e no controle das bactérias patogênicas tem levado à aparição de resistência bacteriana aos antibióticos e à possível transmissão desta resistência dos animais aos humanos através da cadeia alimentar (TEILLANT; BROWER; LAXMINARAYAN, 2015). Assim, tem sido reportado o incremento da colonização de clones de *Staphylococcus aureus* resistentes ao antibiótico Meticilina suínos (BURCH; DURAN; AARESTRUP, 2008), de *Enterococcus* resistente à Vancomicina (VRE) em aves e suínos (IKE et al., 1999; MAASJOST et al., 2015), e de clones de *Salmonella* Enteritidis e *S. Typhimurium* com genes de resistência a diversos antibióticos, em aves criadas intensivamente (YANG et al., 2002; CARRAMIÑANA et al., 2004). Portanto, a crescente preocupação

pelo aumento da resistência bacteriana aos antibióticos ao redor do mundo (WEGENER et al., 1999; McEWEN & FEDORKA-CRAY, 2002; AARESTRUP, DURAN, BURCH, 2008), levou em 1986, que a Suécia fosse o primeiro país da Comunidade Européia a banir o uso dos antibióticos na alimentação animal (CASEWELL et al., 2003). E em 2006 esta proibição foi estendida a toda a Comunidade Européia, através do Regulamento (CE) Nº 1831/2003 do Parlamento Europeu e do Conselho (EUC, 2006). Tal decisão, ocasionou efeitos negativos para a indústria pecuária intensiva, pois dados levantados em sete países da Comunidade Européia revelaram que a proibição do uso dos antibióticos ocasionou perdas econômicas estimadas em US\$ 2,214 bilhões de dólares assim distribuídas (em bilhões de dólares): carne bovina US\$ 0,637, carne de vitela US\$ 0,178, carne suína US\$ 1,103, carne de frango US\$ 0,176 e ovos US\$ 0,030 (SPINOSA; NETO; GÓRNIK, 2005). Similarmente, Kjeldsen e Callesen (2005) reportaram que só na Dinamarca a remoção dos antibióticos como melhoradores do desempenho na alimentação animal, incrementou os custos de produção em 1,04 euros por suíno produzido, levando a um desequilíbrio econômico.

Atualmente, o Brasil é o quarto maior produtor e exportador de carne suína (ABPA, 2014) e, o terceiro produtor e primeiro exportador de carne de frango (ABPA, 2014) do mundo. Devido a esta grande representatividade no mercado mundial, existe muito interesse em encontrar alternativas para substituir os antibióticos e combater o problema de resistência bacteriana. Nesse sentido, enzimas exógenas, ácidos orgânicos, prebióticos, probióticos, extratos de ervas e óleos essenciais tem sido estudados como possíveis alternativas para substituir os antibióticos utilizados na alimentação animal como melhoradores do desempenho (GRIGGS & JACOB, 2005; HUYGHEBAERT, DUCATELLE, VAN INMMERSSEEL, 2011). Assim, por exemplo os probióticos são amplamente estudados e aplicados, com o objetivo de manter o balanço adequado da microbiota gastrointestinal dos animais e prevenir a colonização de bactérias patogênicas. As espécies mais utilizadas como probióticos têm sido *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Bacillus* e *Saccharomyces*, sendo os *Lactobacillus* as mais utilizadas em mamíferos e aves (GAGGIÀ; MATTARELLI; BIAVATI, 2010). Porém, cepas específicas de algumas bactérias esporuladas como *Bacillus subtilis* também estão sendo utilizadas como probióticos, devido a sua ação inibitória contra bactérias patogênicas (LA RAGIONE & WOODWARD, 2003).

Por outro lado, dentro das alternativas botânicas aos antibióticos encontram-se os óleos essenciais, que são um conjunto de compostos voláteis obtidos das plantas e que podem possuir diversas propriedades biológicas (WOLFFENBÜTTEL, 2011). Assim, recentemente os óleos essenciais têm ganhado maior interesse nos setores de produção animal devido a suas propriedades antimicrobianas, já que diversos estudos mostraram a sua efetividade na redução da população de bactérias patogênicas que colonizam o trato gastrointestinal de suínos e aves. Tal redução tem conferido uma certa imunidade aos animais e conseqüentemente tem melhorando o desempenho animal (DIBNER & RICHARDS, 2005; JANG et al., 2007; KIRKPINAR, ÜNLÜ; ÖZDEMİR, 2011; HONG et al. 2012; KHATTAK et al., 2012).

Contudo, tanto os probióticos como os óleos essenciais atuam modulando a composição da microflora gastrointestinal dos animais. Nesse sentido, é importante que os óleos essenciais não afetem às bactérias probióticas e atuem conjuntamente na redução da microflora patogênica para melhorar o desempenho animal. Na literatura existem poucos estudos, cujo objetivo tenha sido avaliar o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais sobre bactérias probióticas, assim Si et al. (2006) e Mathlouthi et al. (2012) mostraram que os óleos essenciais possuem um fraca ou nenhuma ação antibacteriana sobre as bactérias probióticas, destacando o seu potencial antimicrobiano seletivo.

Portanto, o objetivo geral desta pesquisa foi avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de diversos óleos essenciais sobre a microflora patogênica e probiótica de ocorrência no trato gastrointestinal de suínos e aves, destinados à produção de alimentos de origem animal. Para isso, o trabalho foi dividido em quatro capítulos com os seguintes objetivos específicos:

Capítulo 1: Introdução

O primeiro capítulo da dissertação consistiu em uma revisão da literatura contendo as definições básicas.

Capítulo 2: Atividade antibacteriana *in vitro* de óleos essenciais nos micro-organismos patogênicos e probiótica de ocorrência no trato gastrointestinal de suínos e aves.

Objetivo: Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes óleos essenciais avaliados inicialmente de forma individual e posteriormente em misturas binárias sobre bactérias patogênicas e probióticas de ocorrência no trato gastrointestinal de suínos e aves.

Capítulo 3: Atividade antibacteriana *in vitro* de um óleo essencial cítrico e de uma mistura binária de óleos essenciais sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

Objetivo: Avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos dois melhores óleos essenciais e/ou misturas selecionados no Capítulo 2, (Orange Oil Phase Essence e a mistura composta pelos óleos de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus*) sobre *E. faecalis* e *L. rhamnosus* mediante a determinação da Concentração Mínima Inibitória e Concentração Mínima Bactericida para ambas bactérias.

Capítulo 4: Efeito antibacteriano individual e combinado dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Pimenta pseudocaryophyllus* sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

Objetivo: Avaliar o efeito antibacteriano individual e combinado dos óleos essenciais de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* sobre a bactéria patogênica modelo *E. faecalis* e a bactéria probiótica modelo *L. rhamnosus* mediante a determinação dos parâmetros da eficácia antibacteriana (Concentração Mínima Inibitória, Concentração Mínima Bactericida, Índice da Concentração Inibitória Fraccionada, Tempo de morte, Tolerância bacteriana a doses sequenciais do óleo essencial)

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Antimicrobianos melhoradores do desempenho

Os antimicrobianos melhoradores do desempenho ou antibióticos melhoradores do desempenho, são aditivos utilizados na alimentação animal para melhorar o desempenho por redução da colonização de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal dos animais ou por aumentar o crescimento e/ou metabolismo das bactérias benéficas gastrointestinais (JESSEN, 1998; LU et al., 2008).

Segundo Spinosa, Neto e Górnjak (2005) os antimicrobianos permitem a manutenção da microbiota benéfica, mediante a depressão do crescimento dos micro-organismos patogênicos que permite a proliferação dos micro-organismos benéficos. Na Tabela 3.1 é apresentado alguns dos efeitos microbiológicos atribuídos aos aditivos antimicrobianos:

Tabela 1.1 - Mecanismos de ação dos antimicrobianos-aspectos microbiológicos (SPINOSA; NETO; GÓRNIK, 2005)

Eventos Microbiológicos	Efeito*
Bactérias benéficas	+
Bactérias adversas	-
Transferência de resistência	+/-/=
Competição por nutrientes pela microbiota intestinal	-
Síntese de nutrientes pela microbiota intestinal	+
<i>Clostridium perfringens</i>	-
<i>E. coli</i> patogênica	-
<i>E. coli</i> benéfica	+
Estreptococos patogênicos	-
Lactobacilos benéficos	+
Debilidade do patógeno	+

* +, aumento; -, redução; =, sem alteração

O uso de antimicrobianos representam uma ferramenta extremamente importante na produção eficiente de carne suína, carne bovina, carne de frango, e outros produtos de origem animal. Assim, os antimicrobianos são usados em níveis baixos (subterapêuticas), para melhorar a taxa de crescimento e a eficiência da utilização dos alimentos pelo organismo dos animais, para reduzir a mortalidade e morbidade ocasionada por micro-organismos deteriorantes da saúde dos animais, e para melhorar o desempenho reprodutivo (CROMWELL, 2002). Devido a isto, a

utilização de antibióticos na alimentação animal, como melhoradores do desempenho e terapêuticos, é muito alta, sendo que até 1990 mais da metade dos antimicrobianos produzidos no mundo eram destinados para uso na alimentação animal (WEGENER et al., 1990). Recentemente, se estimou que no ano de 2010 o consumo global de antimicrobianos para este fim foi de 63.151 ± 1.560 toneladas, sendo projetado para o 2030 aumento de 67% deste consumo, ou seja, consumo de 105.596 ± 3.605 toneladas de antimicrobianos na alimentação animal (VAN BOECKEL et al., 2015).

Os cinco países com o maior consumo global de antimicrobianos na produção de alimentos de origem animal em 2010, foram China (23%), Estados Unidos (13%), Brasil (9%), Índia (3%) e Alemanha (3%), projetado para 2030 a mesma participação destes países no mercado global, com a exceção da Alemanha que será substituída pelo México (2%). Dos 50 países com os maiores níveis de consumo de antimicrobianos destinados à produção animal em 2010, a Birmânia (205%), Indonésia (202%), Nigéria (163%), Peru (160%) e Vietnã (157%) são os cinco países com projeção de maior aumento no consumo de antimicrobianos para o 2030. China e Brasil estão entre os maiores consumidores de antimicrobianos atualmente, mas não têm projeção de terem rápidos aumentos no consumo de antimicrobianos, já que estes dois países já contam com sistemas de produção animal intensificados, utilizando antimicrobianos para manter a saúde dos animais e aumentar a produtividade (VAN BOECKEL et al., 2015).

Um aspecto de muita relevância nos últimos anos é o fato de que os agentes antimicrobianos estão tendo menor ação sobre as bactérias patogênicas do trato gastrointestinal dos animais, refletindo em uma resistência desses micro-organismos à ação dos antimicrobianos (McEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002). O uso contínuo de antibióticos na alimentação animal está produzindo o surgimento de populações bacteriana cada vez mais resistente aos antimicrobianos e o risco de transmissão dessas bactérias aos seres humanos através da cadeia alimentar está sendo cada vez maior (COLLINGNON, 2004). Assim por exemplo, Wegener et al. (1999) relataram que existiam provas de que o uso do antibiótico glicopeptídeo Avopercina, como promotor de crescimento em animais, tinha criado um importante reservatório de populações de *Enterococcus faecium* com genes de resistência a este antimicrobiano e que estes genes podiam ser transmitidos dos animais para os seres humanos.

O desenvolvimento da resistência aos antimicrobianos em bactérias patogênicas para suínos, complica o tratamento das infecções, sendo um problema de saúde animal e consequentemente econômico (BURCH; DURAN; AAERESTRUP, 2008).

Estudos para determinar o perfil de resistência de *E. coli*, uma das bactérias de maior preocupação na suinocultura por causar diarreia pós-desmame em suínos jovens, mostraram que esta bactéria apresentava maiores índices de resistência para oxitetraciclina e tetraciclina (94%) e os menores índices de resistência para neomicina e ceftiofur (57,4%); antibióticos utilizados amplamente na suinocultura (MENIN et al., 2008). Da mesma forma, Van den Bogaard, London e Stobberingh (2008) relataram a presença de *E. coli* resistente aos antibióticos tetraciclina e sulfa/trimetoprina, usados na suinocultura, em abatedouros da Holanda e Suécia.

A ocorrência de resistência a antibióticos em *Salmonella* spp. parece ter aumentado ao longo dos anos, tem sido associada com a pressão seletiva exercida pela utilização de agentes antimicrobianos em frangos. Durante a última década, os clones de *Salmonella* spp. com resistência a múltiplas drogas, em particular *S. Typhimurium* fagotipos definitivo (DTs) 204b e 104, têm sido amplamente isolados em vários países europeus (LÖHREN; RICCI; CUMMINGS, 2008). Os mesmos autores relataram que isolados de *S. Enteritidis*, obtidos de aves, mostraram altos níveis de resistência para o ácido nalidíxico (até 51,2%) e baixa resistência à tetraciclina (entre 0% e 10,5%).

Devido a este problema de resistência bacteriana aos antibióticos, em 1986, a Suécia foi o primeiro país a proibir o uso dos antimicrobianos promotores de crescimento na alimentação animal. Depois de uma década, em 1997, a União Europeia começou a proibir o uso de alguns antibióticos, sendo avoparcina e bacitracina inicialmente proibidos como promotores de crescimento. Posteriormente em 1999, a proibição foi estendida para os antibióticos espiramicina, tilosina e virginiamicina. Já em 2006 a Comunidade Européia proibiu totalmente o uso de qualquer antibiótico como promotores de crescimento na alimentação animal (TEILLANT; BROWER; LAXMINARAYAN, 2015). Devido a atividade profilática importante destes antimicrobianos a sua retirada trouxe um impacto negativo, associado com uma deterioração na saúde animal, incluindo o aumento da diarreia, perda de peso e mortalidade por *Escherichia coli* e *Lawsonia intra-cellularis* após desmame em leitões jovens (BURCH; DURAN; AAERESTRUP, 2008).

1.1.2 Microbiota gastrointestinal das aves e suínos

Inicialmente, o trato gastrointestinal de um feto é estéril. Durante o processo de nascimento e rapidamente depois disso, os micro-organismos da mãe e do ambiente circundante colonizam o trato gastrointestinal do recém-nascido chegando até uma densa e complexa microbiota desenvolvida, produzida pela mudança na alimentação depois do desmame (DIBNER; RICHARDS, 2005). A sucessão de micro-organismos que colonizam o trato intestinal é mais marcante no início do desenvolvimento, durante o qual o modo de alimentação muda, especialmente na transição do leite materno para o consumo de alimentos sólidos de origem animal. Existem equilíbrios dinâmicos entre a microbiota gastrointestinal, a fisiologia do hospedeiro e a dieta, que influenciam diretamente na aquisição inicial, a sucessão e à eventual estabilidade do ecossistema intestinal (HOLMANA; CHÉNIER, 2015). O intestino estéril começa se colonizar depois do nascimento com bactérias ácido-láticas, enterobactérias e estreptococos (LALLÈS et al., 2007).

A diversidade da microbiota que o trato gastrointestinal de animais vertebrados contém, é grande e diversa, sendo predominantes as bactérias gram-positivas em particular (MACKIE; SGHIR; GASKINS, 1999). A densidade microbiana intestinal de suínos é maior que 10^{10} células por grama de conteúdo intestinal (JENSEN; JORGENSEN, 1994), encontrando-se bactérias indicadoras como *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus faecium*, bactérias causadoras de zoonoses como *Campylobacter*, *Salmonella* sp., *Yersinia enterocolitica*, e bactérias patogênicas como *E. coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus* coagulase-negativa (SCN), *Staphylococcus hyicus* e *Actinobacillus pleuropneumoniae*. No caso de frangos, a composição da microflora intestinal está dada principalmente por micro-organismos gram-positivos: *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Eubacterium* (ceco e colón) e *Clostridium* (ceco e colón), mas também são encontradas bactérias gram-negativas como *Fusobacterium* spp. e *Bacteroides* (SPINOSA; NETO; GÓRNIK, 2005).

A fermentação microbiana dentro do trato gastrointestinal é muito importante para os animais, sendo os principais produtos da fermentação, os ácidos graxos voláteis (AGV), que exercem um papel importante na absorção de água, o controle do pH e a inibição de agentes patogênicos. Em relação à saúde do trato gastrointestinal do hospedeiro, a fermentação (atividade microbiana) é também importante para a

motilidade do intestino, a melhoria do rendimento da energia, a produção de vitamina e a estimulação da imunidade do intestino, sendo envolvido na prevenção de diarreia e na defesa contra agentes patogênicos. A composição da dieta é importante por afetar a composição e atividade da microbiota gastrointestinal (LALLÈS et al., 2007).

1.1.3 Óleos essenciais

“Óleo essencial” define um grupo de substâncias naturais de variável poder aromatizante, de composição mais ou menos complexa que faz parte do organismo de diversas plantas, das quais são extraídos segundo processos específicos para cada caso (SIMÕES; SPITZER, 1999). Em outra definição, os óleos essenciais são compostos secundários produzidos pelas plantas e que são fundamentais para sua sobrevivência como forma de autodefesa (WOLFFENBÜTTEL, 2011).

Do ponto de vista físico-químico, os óleos essenciais apresentam as seguintes características: a) aparência oleosa à temperatura ambiente; b) aroma agradável e intenso da maioria dos óleos; c) são solúveis em solventes orgânicos apolares; d) tem pouca solubilidade em água; d) tem sabor, geralmente ácido e picante (SIMÕES; SPITZER, 1999).

As espécies de plantas que produzem a maioria dos óleos essenciais economicamente mais importantes compreendem as famílias Cupressaceae, Pinaceae, Magnoliopsida, Rosopsida, Liliopsida, Asteraceae ou Compositae, Geraniaceae, Illiciaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Oleaceae, Rosaceae, Santalaceae, Acoraceae, Poaceae e Zingiberaceae (FRANZ; NOVAK, 2010). Flores, folhas, frutos, cascas e rizomas das plantas são matérias-primas para a produção de óleos essenciais; por exemplo, dos óleos essenciais de rosas, eucalipto, canela, gengibre e laranja, respectivamente (PINHEIRO, 2003; BIZZO, HOVELL, REZENDE, 2009).

A extração dos óleos pode ser feita através de técnicas como destilação por arraste a vapor, hidrodestilação, extração com CO₂ supercrítico, expressão a frio, entre outros. Os métodos de extração variam conforme a localização do óleo na planta (flores, folhas, cascas, raízes e rizomas) e sua utilização (WOLFFENBÜTTEL, 2011).

Por serem os óleos muito voláteis, eles se vaporizam rapidamente sob efeito do aumento da temperatura, por isso uma das técnicas de extração mais difundida é

a hidrodestilação, especialmente quando o óleo é extraído das folhas. A hidrodestilação é um método antigo e versátil, na qual o material vegetal permanece em contato com a água em ebulição, o vapor força a abertura das paredes celulares e ocorre a evaporação do óleo que está entre as células da planta. O vapor, consiste na mistura de óleo e água que passa por um condensador, onde ocorre seu resfriamento e, como os componentes voláteis e a água são imiscíveis, ocorre a formação de duas fases líquidas que podem ser separadas (PINHEIRO, 2003).

Os óleos essenciais possuem diversas propriedades biológicas como: antivirais, antifúngicos, antibacterianos, antiparasitários e inseticida (BURT, 2004). Devido a estas propriedades, eles são utilizados na perfumaria, cosmética, indústria alimentícia e farmacêutica. Mas, desde a proibição do uso de antibióticos na alimentação animal e pelas propriedades antimicrobianas que possuem, os óleos essenciais estão sendo amplamente estudados com a finalidade de serem utilizados como antimicrobianos na alimentação animal e poder substituir aos antibióticos como melhoradores do desempenho animal (ALÇIÇEK, BOZKURT, ÇABUK, 2004; ERTAS et al., 2005; CHO et al., 2006; JANZ et al., 2007; WINDISCH et al., 2008; SILVA et al., 2012).

As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais e de seus componentes, isolados ou não, têm sido avaliadas e revisadas por diferentes autores ao longo do tempo (COWAN, 1999; ALIGIANNIS et al., 2001; BERTINI et al., 2005; ABDILLAHI et al., 2008; MATHLOUTHI et al., 2012), sendo o mecanismo de ação dos óleos essenciais, pelo qual exerce o seu poder antimicrobiano, relacionado com a perturbação da membrana citoplasmática e a interrupção da força motriz de prótons nas células bacterianas, do fluxo de elétrons, do transporte ativo e da coagulação dos conteúdos celulares (BURT et al., 2004).

Estudos avaliando as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais como potenciais antimicrobianos na alimentação animal, mostram efeitos positivos no controle de doenças entéricas subclínicas bacterianas em leitões, como a diarreia. Da mesma forma, favorecem o aumento da digestibilidade dos nutrientes e a composição da microbiota intestinal, devido à diminuição da adesão de patógenos ao epitélio intestinal (SILVA et al., 2012), os quais produzem toxinas microbianas e outros metabólitos indesejáveis, como amoníaco e aminas biogênicas que prejudicam a saúde intestinal (FRANZ; BASER; WINDISCH, 2010). Assim, uma melhora no desempenho animal é observada depois da suplementação da ração animal com

óleos essenciais, sugerindo que os óleos essenciais podem atuar de forma equivalente aos antibióticos como promotores de crescimento na nutrição animal (CHO et al., 2006). Além disso, os óleos essenciais mostram um efeito antibacteriano seletivo entre bactérias patogênicas e benéficas (probióticas) do trato gastrointestinal de frangos de corte e suínos, sendo observado um maior efeito inibitório dos agentes patogênicos e um baixo efeito inibitório dos membros benéficos da microbiota intestinal (SI et al., 2006; MATHLOUTHI et al., 2012). Este efeito seletivo pode fortalecer a composição da microbiota intestinal e contribuir para a melhoria da saúde animal (OUWEHAND et al., 2010).

Em geral, o efeito benéfico atribuído aos óleos essenciais sobre suínos e aves, se deve principalmente ao efeito direto sobre o trato gastrointestinal dos animais, proporcionando aumento das secreções digestivas e da absorção de nutrientes redução do estresse patogênico no intestino; além de ter uma atividade antioxidantes e de reforçar o status imune do animal, resultando na melhora do desempenho animal (ZENG et al., 2015). Estima-se que mais de 3.000 óleos essenciais são conhecidos, mas os principais compostos obtidos deles como cinemaldeído, carvacrol, eugenol e timol recebem atualmente o maior interesse para emprego na alimentação animal (THACKER, 2013). Os óleos essenciais são utilizados também para melhorar o sabor e palatabilidade dos alimentos para os animais, aumentando assim o consumo voluntário, resultando em melhor ganho de peso do animal (ZENG et al., 2015).

Referencias

AARESTRUP, F.M.; DURAN, O.C.; BURCH, D.G.S. Antimicrobial resistance in swine production. **Animal Health Research Reviews**, London, v. 9, n. 2, p. 135-148, 2008.

ABDILLAH, H.S.; STAFFORD, G.I.; FINNIE, J.F.; VAN STADEN, J. Antimicrobial activity of South African *Podocarpus* species. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 119, n. 1, p. 191-194, 2008.

ALÇIÇEK, A.; BOZKURT, M.; ÇABUK, M. The effect of a mixture of herbal essential oils, an organic acid or a probiotic on broiler performance. **South African Journal of Animal Science**, Pretoria, v. 34, n. 4, p. 217-222, 2004.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, I.B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of**

Agricultural and Food Chemistry, Easton-Pennsylvania, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, 2001.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. EXPORTAÇÃO MUNDIAL DE CARNE SUÍNA EM 2014 (mil Ton). Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/suinocultura/mercado-mundial>> Acesso em: 10 jun. 2014.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. PRODUÇÃO MUNDIAL DE CARNE DE FRANGO EM 2014 (mil ton). Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/mercado-mundial>> Acesso em: 10 jun. 2015.

BERTINI, L.M.; PEREIRA, A.F.; OLIVEIRA, C.D.L.; MENEZES, E.A.; MORAIS, S.D.; CUNHA, F.A.; CAVALCANTI, E.S.B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, Brasília, v. 17, n. 3/4, p. 80-83, 2005.

BIZZO, H.R.; HOVELL, A.M.C.; REZENDE, C.M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BRENES, A.; ROURA, E. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 158, n. 1, p. 1-14, 2010.

BURCH, D.G.S.; DURAN, C.O.; AARESTRUP, F.M. Guidelines for antimicrobial use in swine. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. (Ed.). **Guide to Antimicrobial Use in Animals**. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing, 2008. chap. 7, p. 102-125.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods-A Review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

CARRAMINANA, J.J.; ROTA, C.; AGUSTIN, I.; HERRERA, A. High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 104, n. 1, p. 133-139, 2004.

CASEWELL, M.; FRIIS, C.; MARCO, E.; MCMULLIN, P.; PHILLIPS, I. The European ban on growth-promoting antibiotics and emerging consequences for human and animal health. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 52, n. 2, p. 159-161, 2003.

CHO, J.H.; CHEN, Y.J.; MIN, B.J.; KIM, H.J.; KWON, O.S.; SHON, K.S.; KIM, J.S.; ASAMER, A. Effects of essential oils supplementation on growth performance, IgG concentration and fecal noxious gas concentration of weaned pigs. **Asian Australasian Journal of Animal Sciences**, Seoul, v. 19, n. 1, p. 80, 2006.

COLLIGNON, P. Antibiotic growth promoters. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 54, n. 1, p. 272-272, 2004.

COWAN, M.M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

CROMWELL, G.L. Antimicrobial agents. In: MILLER, E.R.; ULLREY, D.R.; LEWIS, A.J. **Swine Nutrition**. Stoneham: Butterworth-Heinemann, 1991. chap. 17, p. 297-314.

CROMWELL, G.L. Why and how antibiotics are used in swine production. **Animal Biotechnology**, New York, v. 13, n. 1, p. 7-27, 2002.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, Champaign-Illinois, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005.

ERTAS, O.N.; TALAT, G.; MEHMET, C.; BESTAMI, D.; SIMSEK, U.G. The effect of an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 4, n. 11, p. 879-884, 2005.

EUROPEAN UNION COMMISSION (EUC). Regulation (EC) No. 1831/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003; on additives for use in animal nutrition. **Official Journal of the European Union**, Aberdeen, v. 286, p. 29-43, 2003.

FAIRBROTHER, J.M.; NADEAU, É.; GYLES, C.L. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research Reviews**, London, v. 6, n. 1, p. 17-39, 2005.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. Meat consumption. Disponível em: <<http://faostat.fao.org/site/603/default.aspx#ancor>>. Acesso em: 10 jul. 2014.

FRANZ, C.; NOVAK, J. Sources of Essential Oils. In: BASER, K.H.C.; BUCHBAUER, G. (Ed.). **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC Press, 2009. chap. 3 p. 39-81.

FRANZ, C.; BASER, K.H.C.; WINDISCH, W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. **A review. Flavor and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, n. 5, p. 327-340, 2010.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, p. S15-S28, 2010.

GRIGGS, J.P.; JACOB, J.P. Alternatives to antibiotics for organic poultry production. **The Journal of Applied Poultry Research**, Oxford, v. 14, n. 4, p. 750-756, 2005.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. (Ed.).

Guide to Antimicrobial Use in Animals. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing , 2008. chap. 1, p. 1-12.

HOLMAN, D.B.; CHÉNIER, M. R. Antimicrobial use in swine production and its effect on the swine gut microbiota and antimicrobial resistance. **Canadian journal of microbiology**, Ottawa, v. 61, n. 11, p. 785-798, 2015.

HONG, J.C.; STEINER, T.; AUFY, A.; LIEN, T.F. Effects of supplemental essential oil on growth performance, lipid metabolites and immunity, intestinal characteristics, microbiota and carcass traits in broilers. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 144, n. 3, p. 253-262, 2012.

HUYGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, London, v. 187, n. 2, p. 182-188, 2011.

IKE, Y.; TANIMOTO, K.; OZAWA, Y.; NOMURA, T.; FUJIMOTO, S.; TOMITA, H. Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. **The Lancet**, London, v. 353, n. 9167, p. 1854, 1999.

JANG, I.S.; KO, Y.H.; KANG, S.Y.; LEE, C.Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 134, n. 3, p. 304-315, 2007.

JANZ, J.A.M.; MOREL, P.C.H.; WILKINSON, B.H.P.; PURCHAS, R.W. Preliminary investigation of the effects of low-level dietary inclusion of fragrant essential oils and oleoresins on pig performance and pork quality. **Meat Science**, Barking, v. 75, n. 2, p. 350-355, 2007.

JENSEN, B.B. The impact of feed additives on the microbial ecology of the gut in young pigs. **Journal of Animal and Feed Sciences**, Jabłonna-Polonia, v. 7, p. 45-64, 1998.

JENSEN, B.B.; JØRGENSEN, H. Effect of dietary fiber on microbial activity and microbial gas production in various regions of the gastrointestinal tract of pigs. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 60, n. 6, p. 1897-1904, 1994.

KHATTAK, F.; RONCHI, A.; CASTELLI, P.; SPARKS, N. Effects of natural blend of essential oil on growth performance, blood biochemistry, cecal morphology, and carcass quality of broiler chickens. **Poultry science**, Champaign-Illinois, v. 93, n. 1, p 132-137, 2014.

KIRKPINAR, F.; ÜNLÜ, H.B.; ÖZDEMİR, G. Effects of oregano and garlic essential oils on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 137, n. 1, p. 219-225, 2011.

- KJELDSEN, N.; CALLESEN, J. Terminated use of antimicrobial growth promoters in pig production in Denmark: effects on pig welfare and productivity. In: BOKU SYMPOSIUM IN ANIMAL NUTRITION: Animal feed without antibiotic, 4., 2005. Vienna. **Proceedings....** Vienna, 2005. p. 57-63.
- LA RAGIONE, R.M.; WOODWARD, M.J. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n 3, p. 245-256, 2003.
- LALLES, J.P.; BOSI, P.; SMIDT, H.; STOKES, C.R. Nutritional management of gut health in pigs around weaning. **Proceedings of the Nutrition Society**, London, v. 66, n. 2, p. 260-268, 2007.
- LÖHREN, U.; RICCI, A.; CUMMINGS, T.S. Guidelines for antimicrobial use in poultry. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. (Ed.). **Guide to Antimicrobial Use in Animals**. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing, 2008. chap. 8, p. 126-142.
- LU, J.; HOFACRE, C.; SMITH, F.; LEE, M.D. Effects of feed additives on the development on the ileal bacterial community of the broiler chicken. **Animal: an International Journal of Animal Bioscience**, London, v. 2, n. 5 p. 669, 2008.
- MAASJOST, J.; MÜHLDOERFER, K.; DE JÄCKEL, S. C.; HAFEZ, H. M. Antimicrobial susceptibility patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from poultry flocks in Germany. **Avian Diseases**, Kennett Square-Pennsylvania, v. 59, n. 1, p.143-148, 2015.
- MACKIE, R.I.; SGHIR, A.; GASKINS, H.R. Developmental microbial ecology of the neonatal gastrointestinal tract. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda-Maryland, v. 69, n. 5, p. 1035s-1045s, 1999.
- MATHLOUTHI, N.; BOUZAIENNE, T.; OUESLATI, I.; RECOQUILLAY, F.; HAMDI, M.; URDACI, M.; BERGAOUI, R. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: *in vitro* antimicrobial activities and effects on growth performance. **Journal of Animal Science**, Champaign-Illinois, v. 90, n. 3, p. 813-823, 2012.
- McEWEN, S.A.; FEDORKA-CRAY, P.J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago-Illinois v. 34, n. Supplement 3, p. S93-S106, 2002.
- MENIN, A.; RECK, C.; SOUZA, D.D.; KLEIN, C.; VAZ, E. Agentes bacterianos enteropatogênicos em suínos de diferentes faixas etárias e perfil de resistência a antimicrobianos de cepas de *Escherichia coli* e *Salmonella* spp. **Ciência Rural**, Santa Maria- Rio Grande do Sul, v. 38, n. 6, p. 1687-1693, 2008.
- OUWEHAND, A.C.; TIIHONEN, K.; KETTUNEN, H.; PEURANEN, S.; SCHULZE, H.; RAUTONEN, N. *In vitro* effects of essential oils on potential pathogens and beneficial

members of the normal microbiota. **Veterinarni Medicina**, Praha, v.55, n. 2, p. 71-78, 2010.

PINHEIRO, A.L. Produção de óleos essenciais. **Série Agroindústria Manual**, Viçosa-Minas Gerais, n. 463, 2003.

SI, W.; GONG, J.; TSAO, R.; ZHOU, T.; YU, H.; POPPE, C.; JOHNSON, R.; DU, Z. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 2, p. 296-305, 2006.

SILVA, T.R.G.D.; MARTINS, T.D.D.; SILVA, J.H.V.; SILVA, L.D.P.G.D.; PASCOAL, L. A.F.; OLIVEIRA, E.R.A.D.; BRITO, M.S. Inclusão de óleos essenciais como elementos fitoterápicos na dieta de suínos. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, Salvador-Bahia, v. 13, n. 1, p. 181-191, 2012.

SIMÕES, C.M.O.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In:_____ SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P. (Ed.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora UFSC, 1999. chap. 28, p. 390-425.

SPINOSA, H.de Souza; NETO, J.P.; GÓRNIK, S.L. **Farmacologia aplicada à avicultura**. São Paulo: Roca, 2005, p. 155-159.

TEILLANT, A.; BROWER, C.H.; LAXMINARAYAN, R. Economics of Antibiotic Growth Promoters in Livestock. **Annual Review of Resource Economics**, Palo Alto-California, v. 7, n. 1, p. 349-374, 2015.

THACKER, P.A. Alternatives to antibiotics as growth promoters for use in swine production: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 4, n. 35, p. 1-12, 2013.

VAN BOECKEL, T.P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B.T.; LEVIN, S.A.; ROBINSON, T.P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015.

VAN DEN BOGAARD, A.E.J.M.; LONDON, N.; STOBBERINGH, E.E. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 45, n. 5, p. 663-671, 2000.

WEGENER, H.C.; AARESTRUP, F.M.; JENSEN, L.B.; HAMMERUM, A.M.; BAGER, F. Use of antimicrobial growth promoters in food animals and *Enterococcus faecium* resistance to therapeutic antimicrobial drugs in Europe. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 5, n. 3, p. 329, 1999.

WINDISCH, W.; SCHEDULE, K.; PLITZNER, C.; KROISMAYR, A. Use of phytogenic products as feed additives for swine and poultry. **Journal of Animal Science**, Champaign-Illinois, v. 86, n. 14_suppl, p. E140-E148, 2008.

WOLFFENBÜTTEL, A.N. Base da Química dos Óleos Essenciais e Aromaterapia. **Abordagem Técnica e Científica**. São Paulo: Roca, 2010. chap.1. p.1-25.

YANG, S.J.; PARK, K.Y.; KIM, S.H.; NO, K.M.; BESSER, T.E.; YOO, H.S., KIM, S.H.; LEE, B. K.; PARK, Y.H. Antimicrobial resistance in *Salmonella enterica* serovars Enteritidis and Typhimurium isolated from animals in Korea: comparison of phenotypic and genotypic resistance characterization. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 86, n. 4, p. 295-301, 2002.

ZENG, Z.; ZHANG, S.; WANG, H.; PIAO, X. Essential oil and aromatic plants as feed additives in non-ruminant nutrition: a review. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, London, v. 6, n. 1, p. 7, 2015.

2 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS EM MICRO-ORGANISMOS PATOGÊNICOS E PROBIÓTICOS DE OCORRÊNCIA NO TRATO GASTROINTESTINAL DE SUÍNOS E AVES

Resumo

Os antibióticos melhoradores de desempenho têm sido utilizados na dieta dos animais para reduzir a mortalidade e aumentar a taxa de crescimento dos animais. Porém, o surgimento da resistência bacteriana aos antibióticos e seu aumento com o tempo, é uma preocupação ao redor do mundo, assim como a possível transmissão desta resistência bacteriana ao humanos. Portanto, em 2006 a Comunidade Europeia banuiu o uso dos antibióticos na alimentação animal. Estudos com óleos essenciais têm mostrado um potencial antibacteriano e podem ser uma boa alternativa como antimicrobianos melhoradores do desempenho. O objetivo deste estudo foi de avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana de diferentes óleos essenciais, individualmente ou em misturas binárias, sobre bactérias patogênicas e probióticas de ocorrência no trato gastrointestinal de suínos e frangos de corte. Inicialmente, foi realizado um levantamento da atividade antibacteriana de vinte oito óleos essenciais mediante o método de difusão em disco sobre uma representativa bactéria patogênica *Salmonella* serotipo Enteritidis e sobre uma bactéria probiótica *Lactobacillus plantarum*. A análise de variância (ANOVA) mostrou uma diferença significativa na atividade antibacteriana entre os óleos essenciais testados e o teste de Tukey ($P < 0,05$) permitiu diferenciá-los. Assim, os óleos essenciais obtidos de *Eucalyptus globulus*, *E. exserta*, *Pimenta pseudocaryophyllus*, e dois óleos essenciais que foram subprodutos da produção de suco de laranja, Orange oil phase essence, e Citrus Terpens foram selecionados baseados na sua maior atividade sobre a bactéria patogênica (*S. Enteritidis*) e sua menor atividade sobre a bactéria probiótica (*L. plantarum*). Estes cinco óleos essenciais foram testados individualmente sobre outras quatro bactérias patogênicas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Listeria innocua*, e sobre duas bactérias probióticas: *Lactobacillus rhamnosus* e *Bacillus subtilis*. As misturas binárias obtidas dos cinco óleos essenciais foram avaliadas sobre estas seis bactérias além da *S. Enteritidis* e *L. plantarum*. Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpens foram os óleos que mostraram a maior atividade sobre as bactérias patogênicas e a menor atividade sobre as bactérias probióticas ($P < 0,05$), sendo eles os que mostraram a melhor atividade antibacteriana seletiva.

Palavras-chave: Atividade antibacteriana; Óleos essenciais; Bactérias probióticas; Bactérias patogênicas; Frangos e suínos

Abstract

Antibiotic growth promoters have been used in animal diet in order to reduce mortality and increase animal performance. However, the emergence of the bacterial resistance to antibiotics and its increase with the time is a growing concern around the world, as well as the possible transmission of this bacterial resistance to humans. Thus, in 2006 the European Community prohibited the use of antibiotics in animal feed. Studies with essential oils have shown potential antibacterial activity and they could be an alternative as growth promoters. The objective of this research was to evaluate, *in vitro*, the antibacterial activity of different essential oils, individually and in binary blends, on pathogenic and probiotic bacteria of occurrence in gastrointestinal tract of swine and poultry. Initially, was performed an screening of twenty-eight essential oils (EO) for their antibacterial activity by disk diffusion method on a representative pathogen bacterium *Salmonella* serotype Enteritidis and a probiotic bacterium *Lactobacillus plantarum*. Analysis of variance (ANOVA) showed a significant difference in the antibacterial activity between the EO's tested, and Tukey's test ($p \leq 0.05$) allowed distinguishing them. Thereby, EO's obtained from *Eucalyptus globulus*, *E. exserta*, *Pimenta pseudocaryophyllus*, and also two EO's which are by-products of orange juice production, Orange Oil Phase Essence, and Citrus Terpens were selected based on their greatest activity on pathogenic bacterium (*S. Enteritidis*) and their lowest activity on probiotic bacterium (*L. plantarum*). These five essential oils were tested individually on other four pathogenic bacteria: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Listeria innocua*, and on two probiotic bacteria: *Lactobacillus rhamnosus* and *Bacillus subtilis*. The ten binary blends obtained from five EO's were tested on these six bacteria besides *S. Enteritidis* and *L. plantarum*. Orange Oil Phase Essence and Citrus Terpens were oils that showed greater activity on pathogenic bacteria and lower activity on probiotic bacteria ($p \leq 0.05$), being that they showed the best selective antibacterial activity.

Keywords: Antibacterial activity; Essential oil; Pathogenic bacteria; Probiotic bacteria; Poultry and swine

Resumen

Los antibióticos promotores de crecimiento han sido utilizados en la dieta de los animales para reducir la mortalidad e aumentar el desempeño animal. Sin embargo, el surgimiento de la resistencia bacteriana a los antibióticos e su incremento con el tiempo, es una preocupación en todo el mundo, así como la posible transmisión de esta resistencia bacteriana a los humanos. Por eso, en 2006 la Comunidad Europea prohibió el uso de antibióticos en la alimentación animal. Estudios con aceites esenciales han mostrado tener un potencial antibacteriano e pueden ser una alternativa como antimicrobianos mejoradores de desempeño. El objetivo de esta investigación fue de evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de diferentes aceites esenciales, individualmente y en mezclas binarias, sobre bacterias patógenas y probióticas de ocurrencia en el tracto gastrointestinal de cerdos y aves de corral. Inicialmente, fue realizado un levantamiento de la actividad antibacteriana de veintiocho aceites esenciales a través del método de difusión en disco sobre una bacteria modelo patógena, *Salmonella* serotipo Enteritidis, e sobre una bacteria probiótica, *Lactobacillus plantarum*. El análisis de varianza (ANOVA) mostró una diferencia significativa en la actividad antibacteriana entre los aceites esenciales probados y el test de Tukey ($P < 0,05$) permitió diferenciarlos. Así, los aceites esenciales obtenidos de *Eucalyptus globulus*, *E. exserta*, *Pimenta pseudocaryophyllus*, y dos aceites esenciales obtenidos como subproducto de la producción de zumo de naranja, Orange Oil Phase Essence, y Citrus Terpens fueron seleccionados basados en su mayor actividad sobre la bacteria patógena (*S. Enteritidis*) y su menor actividad sobre la bacteria probiótica (*L. plantarum*). Estos cinco aceites esenciales fueron probados individualmente sobre otras cuatro bacterias patógenas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Enterococcus faecalis* and *Listeria innocua*, y sobre dos bacterias probióticas *Lactobacillus rhamnosus* e *Bacillus subtilis*. Las misturas binarias obtenidas de los cinco aceites esenciales fueron probados sobre esas bacterias, además de *S. Enteritidis* y *L. plantarum*. Orange Oil Phase Essence y Citrus Terpens fueron los aceites que mostraron una mayor actividad sobre las bacterias patógenas y una menor actividad sobre las bacterias probióticas ($P < 0,05$), siendo ellos los que mostraron una mejor actividad antibacteriana selectiva.

Palabras claves: Actividad antibacteriana; Aceites esenciales; Bacterias probióticas; Bacterias patógenas; Pollos y cerdos

2.1 Introdução

A produção de suínos e aves vem empregando a longo tempo, como consequência da intensificação de sua produção, os chamados promotores de crescimento, antibióticos que inibem o crescimento dos micro-organismos, reduzindo a microflora patogênica, e assim proporcionando menor dispêndio de energia por parte do organismo animal, resultando em um efeito positivo na eficiência produtiva. Contudo, desde o início do uso de antibióticos em doses subterapêuticas com a função de servir como promotores de crescimento na produção animal, têm existido relatos do aparecimento de resistência em populações bacterianas a alguns antibióticos utilizados, e conseqüentemente surgiu a preocupação com o possível aparecimento da resistência em patógenos humanos (DIBNER; RICHARDS, 2005).

Como resultado desta preocupação alguns países, como a Suécia em 1986 (AARESTRUP, 2003) e Dinamarca em 2000 (WHO, 2000) isoladamente baniram o uso dos promotores de crescimento, e em 2006 a Comunidade Européia estendeu essa proibição para todos os estados membros.

A proibição do uso dos antimicrobianos melhoradores do desempenho na alimentação animal tem provocado uma intensa procura por meios alternativos para manter a eficiência produtiva em criações sem a utilização destes aditivos. Dentre as alternativas os óleos essenciais por suas características antimicrobianas têm recebido bastante atenção (FRANZ; BASER; WINDISCH, 2010). Assim, alguns estudos têm explorado, através de uma triagem, a atividade antibacteriana de diversos óleos essenciais sobre um grupo variado de bactérias patogênicas (SI et al., 2006; PRABUSEENIVASAN, JAYAKUMAR, IGNACIMUTHU, 2006; ELAISSI et al., 2011).

Os óleos essenciais têm sido avaliados, individualmente, para verificação de sua atividade antibacteriana frente a bactérias patogênicas, com o objetivo de serem incluídos na dieta dos animais como potenciais antimicrobianos (KIRKPINAR et al., 2011; MATHLOUTHI et al., 2012). Além disso, o efeito sinérgico potencializando seus resultados têm sido relatado em misturas ou combinações de óleos essenciais (HYLDGAARD et al., 2012). Alguns estudos já avaliaram misturas de diferentes óleos essenciais na alimentação de suínos e aves, com o objetivo de obter melhores resultados na inibição de bactérias patogênicas e no melhoramento do desempenho animal (ERTAS et al., 2005; JANG et al. 2007; KHATTAK et al., 2014).

Entretanto, sabe-se que uma ótima composição da microbiota gastrointestinal é necessária para saúde intestinal do animal, permitindo alcançar um status imune frente a agentes prejudiciais, como as bactérias patogênicas (CHOCT, 2009). Entre os micro-organismos que compõem a microbiota gastrointestinal dos animais, encontram-se as chamadas bactérias benéficas ou probióticas, como as gram-positivas *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, cuja ação benéfica é a inibição de bactérias patogênicas por exclusão competitiva (SUGIHARTO, 2014). Devido a isto, diversas cepas de *Lactobacillus* vem sendo aplicadas como probióticos na alimentação animal (GAGGIÀ; MATTARELLI; BIAVATU, 2010).

Desta maneira, é desejável que os óleos essenciais sejam seletivos, exercendo ação antibacteriana sobre as bactérias patogênicas e não sobre as bactérias benéficas do trato gastrointestinal dos animais (OUWEHAND et al., 2010; LI et al., 2012) e dessa forma possam contribuir conjuntamente com as bactérias probióticas, na inibição das bactérias patogênicas. Neste contexto, o presente estudo teve como finalidade avaliar, a atividade antibacteriana *in vitro* de diferentes óleos essenciais, avaliados inicialmente de forma individual e posteriormente em misturas binárias, sobre bactérias patogênicas e probióticas de ocorrência no trato gastrointestinal de suínos e aves.

2.2 Material e Métodos

2.2.1 Origem dos materiais

No presente estudo, trabalhou-se com vinte oito óleos essenciais, dos quais, vinte foram obtidos diretamente de folhas ou rizomas de diferentes espécies vegetais cuja procedência indica-se na Tabela 2.1. Os oito óleos essenciais restantes constituíram óleos comerciais que foram subprodutos do processamento de laranja para obtenção de suco, e foram provenientes de uma fábrica localizada no Estado de São Paulo, Brasil. Estes óleos cítricos receberam a seguinte denominação (estabelecida pela empresa) de acordo com a etapa do processamento da qual foram extraídos: Orange Peel Oil, Oil Five Fold, Orange Oil Phase Essence, Orange Terpens, Thaiti Lime Water, Thaiti Lime Oil Phase, Thaiti Lime Peel Oil, Citrus Terpens.

Tabela 2.1- Espécies vegetais utilizadas no experimento para extração dos óleos essenciais

Espécie vegetal			Material vegetal	Procedência
<i>Baccharis dracunculifolia</i> , <i>verbenácea</i> .	<i>Cordia</i>		Folhas	Instituto agrônomo de Campinas 22°53'36.3"S 47°03'55.6"W
<i>Cymbopogon citratus</i> , <i>Lippia alba</i> , <i>Thymus vulgaris</i> , <i>Lippia sidoides</i> .			Folhas	CPQBA-UNICAMP* 22°47'42.5"S 47°06'40.4"W
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>			Folhas	Registro - São Paulo/Brasil 24° 29' 16" S, 47° 50' 38" W
<i>Eucalyptus camaldulensis</i> , <i>Eucalyptus crebra</i> , <i>Eucalyptus exserta</i> , <i>Eucalyptus glóbulos</i> , <i>Eucalyptus grandis</i> , <i>Eucalyptus staigeriana</i> , <i>Eucalyptus urograndis</i> , <i>Eucalyptus urophylla</i> , <i>Eucalyptus citriodora</i> .			Folhas	Itatinga- São Paulo/Brasil** 22°59'34.8"S 48°41'14.4"W
<i>Zingiber officinale</i>			Rizoma	Piracicaba- São Paulo/Brasil 22°43'31"S 47°38'57"O
<i>Melaleuca alternifolia</i> , <i>leucadendron</i>	<i>Melaleuca</i>		Folhas	Piracicaba- São Paulo/Brasil 22°43'31"S 47°38'57"O
<i>Mintostachys mollis</i>			Folhas	Cochas-El Tambo/Huancayo- Junín/Peru 12°00'31.0"S 75°11'49.2"W

*Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas (CPQBA) - UNICAMP.

**Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga - ESALQ/USP.

2.2.2 Extração dos óleos essenciais

Os vinte óleos essenciais provenientes de folhas e rizomas foram obtidos pelo processo de hidrodestilação durante 4 horas utilizando um destilador tipo Clevenger. A proporção (peso/volume) do material vegetal e água destilada foi de 1:5. O volume do óleo essencial obtido foi mensurado e após isto desidratado através da passagem por uma camada de sulfato de sódio anidro. Os óleos assim desidratados foram armazenados em um frasco âmbar mantido sob refrigeração (4 °C) e ao abrigo da luz, aguardando sua utilização.

2.2.3 Isolados bacterianos

Todas as linhagens bacterianas avaliadas no presente trabalho foram linhagens padrões pertencentes à American Type Culture Collection (ATCC). Para o presente trabalho as bactérias foram classificadas em patogênicas e probióticas de acordo com a importância para a suinocultura e avicultura, como sinalado na Tabela 2.2. As bactérias patogênicas avaliadas foram: *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria innocua* ATCC 33090 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212; e as bactérias probióticas testadas foram: *Bacillus subtilis* ATCC 6623, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

Tabela 2.2 – Micro-organismos utilizadas no experimento

Micro-organismos	Gram	Classificação	Importância
<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076	-	Patogênica	Causante de infecções entéricas (FAIRBROTHER; NADEAU; GYLES, 2005; BURCH, DURAN, AARESTRUP, 2008; LÔHREN, RICCI, CUMMINGS, 2008)
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	-	Patogênica	
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	+	Patogênica	Prevalência e colonização de <i>S. aureus</i> resistentes a Meticilina (DE NEELING et al., 2007; CUI et al., 2009; KÔCK et al., 2009)
<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090	+	Patogênica	Prevalência em abatedouros e produtos de origem animal (AUTIO et al., 2000; MORENO et al., 2012)
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212	+	Patogênica	Habitante do trato gastrointestinal. Resistente a múltiplos antibióticos, especialmente a Vancomicina (VRE) (IKE et al., 1999; VAN DEN BOGAARD, et al., 2000)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6623	+	Probiótica	Formador de esporo, utilizadas como probiótico (LA RAGIONE & WOODWARD, 2003; MOLNÀR et al. 2011).
<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014	+	Probiótica	Espécies utilizados como probióticos em animais. Possuem status QPS*. (GAGGIÀ et al., 2010)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	+	Probiótica	

* Qualified Presumption of Safety, ou suposição de segurança qualificada de micro-organismos

2.2.4 Atividade antimicrobiana

2.2.4.1 Triagem inicial

Todos os óleos essenciais foram submetidos inicialmente a uma triagem visando mensurar a atividade antibacteriana, mediante o método de difusão em disco, seguindo o protocolo M02-A11 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012). Esta triagem foi realizada utilizando-se uma bactéria patogênica gram-negativa, a *Salmonella* Enteritidis ATCC 13076 e uma probiótica gram-positiva *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014.

Cada óleo essencial foi preparado em uma concentração de 90% (v/v) utilizando como solvente a acetona, para melhorar a difusão dos óleos essenciais. A preparação do inóculo padrão de cada bactéria foi realizada a partir de colônias vivas de *S. Enteritidis* contidas em uma placa de ágar TSA (Ágar Triptona de Soja - Difco), incubada a 37°C por 18-20 horas, e no caso do *L. plantarum* a partir de colônias vivas contidas em uma placa de ágar MRS (Lactobacilli MRS Agar-Difco) incubada por 48 horas. As colônias foram trasladadas a um tubo contendo solução salina de cloreto de sódio 0,85% até atingir a densidade óptica do padrão 0,5 Mc Farland (Absorbância 0,08 a 0,1 a 625 nm), a qual corresponde a $\sim 10^8$ UFC/mL (CLSI, 2012). Placas de ágar Mueller Hinton (*S. Enteritidis*) ou MRS (*L. plantarum*) foram inoculadas com o correspondente inóculo padrão de cada bactéria. Sete microlitros da solução de cada óleo essencial (90% v/v) foram colocados sobre três discos estéreis de papel (Whatman No. 3, de 6 mm de diâmetro), os quais foram transferidos para placas Petri de 9 cm de diâmetro contendo ágar inoculado com a bactéria correspondente. Um disco do antibiótico estreptomicina (10 µg/disco) foi colocado como controle positivo e como controle negativo um disco com 10 µL de acetona foi também colocado na placa. As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas para a *S. Enteritidis* e a 30 °C por 48 horas para o *L. plantarum*. Os Diâmetros da Zona de Inibição (DZI) foram medidos depois do período de incubação com auxílio de um paquímetro. O experimento foi realizado em triplicata.

Os cinco óleos essenciais que apresentaram maiores DZIs para a bactéria patogênica e menor DZIs para a bactéria probiótica foram considerados ter alguma seletividade entre bactérias patogênicas e probióticas e foram selecionados para prosseguir nas avaliações subsequentes.

2.2.4.2 Estudo nos óleos selecionados

Os cinco óleos essenciais selecionados foram avaliados individualmente e em misturas binárias, totalizando 10 misturas. Ambos, óleos individuais e misturas, foram avaliados pelo método de difusão em disco como descrito anteriormente, entretanto utilizando-se adicionalmente quatro bactérias patogênicas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Listeria innocua* ATCC 33090 e *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 e duas bactérias probióticas: *Bacillus subtilis* ATCC 6623 e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

Para a avaliação da atividade antibacteriana as misturas binárias foram preparadas na proporção 1:1. A concentração de cada mistura foi de 90% v/v (90 µL da mistura de dois óleos e 10 µL de acetona). Como as misturas não foram avaliadas na triagem inicial, nesta etapa as misturas foram avaliadas sobre as bactérias anteriormente citadas, mas também sobre a bactéria patogênica *S. Enteritidis* e sobre a bactéria probiótica *L. plantarum*.

Para avaliar a interação dos óleos essenciais que integraram cada mistura propusemos neste estudo a determinação do Índice do Efeito Inibitório (EI), que foi uma modificação do índice da Concentração Inibitoria Fraccionada (CIF), comumente utilizada para avaliar a interação de óleos essenciais combinados. Assim o índice do EI, a diferença do CIF, foi calculado com base dos DZIs médios apresentados pelos óleos individuais em relação aos DZIs médios apresentados pelas misturas (Tabela 2.6). Portanto o IEI foi calculado com base nas seguintes equações:

$$EI_A = \frac{\text{Diâmetro da zona de inibição (A)}}{\text{Diâmetro da zona de inibição (Mistura OE}_{A+B})}$$

$$EI_B = \frac{\text{Diâmetro da zona de inibição (B)}}{\text{Diâmetro da zona de inibição (Mistura OE}_{A+B})}$$

$$IEI = \sum EI = EI_A + EI_B$$

Onde o valor de IEI (Índice do efeito inibitório) < 1 indicou sinergia; $IEI > 1$ indicou antagonismo e o valor $IEI = 1$ indicou interação aditiva da mistura.

A distribuição dos IEIs foi apresentada graficamente através de isobogramas, onde os eixos representaram a relação entre os DZIs dos óleos individuais e os DZIs apresentados pelos óleos dentro da mistura binária (Fig. 2). Uma linha reta representou o efeito exercido pelo óleo individual em relação à mistura, indicando que quando os óleos essenciais são utilizados isoladamente, produzem o mesmo efeito quando utilizados nas misturas binárias, sendo as inibições exercidas igualmente eficazes ($IE_A + IE_B = 1$). Portanto, quando a soma das IEIs foi igual a 1, localizou às misturas sobre a linha aditiva, quando a soma das IEIs foi < 1 as misturas foram localizados embaixo à linha aditiva indicando um efeito sinérgico e quando a soma das IEIs foi > 1 as misturas foram localizadas acima da linha aditiva indicando um efeito antagônico.

2.2.5 Determinação da composição química dos óleos essenciais

A caracterização da composição química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando um Cromatógrafo Gasoso equipado com um detector de massas GC/MS QP2010 Plus – SHIMADZU, com uma coluna cromatográfica capilar Difenil Dimetil polissiloxano (5% *diphenyl* e 95% *dimethyl polysiloxane*), com 30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m, modelo Rtx®-5MS (RESTEK). A programação da temperatura estabelecida para o forno iniciou-se com 50°C por 1,5 min, elevação de 4°C/min até 200°C, e então elevação de 10°C/min até 240°C, permanecendo nesta temperatura por 7 min. A temperatura do injetor foi de 240°C e da fonte de íons e interface de 220°C. A injeção foi feita no modo “Split” e o volume de amostra injetado foi de 1 μ L. A razão do “Split” foi de 1:200. O Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1,2 mL/min. O detector de massas operou no modo scan com faixa de varredura de 40 a 500 m/z. Os compostos voláteis foram identificados através da comparação entre os índices de Kovats (IK) calculados e observados em bibliotecas existentes da literatura (WILEY 8, NIST 07, NIST WebBook) e entre os respectivos espectros de massa. Somente picos com presença maior que 1% da área total do cromatograma foram identificados.

2.2.6 Análise dos resultados

Os dados do Diâmetro da Zona de Inibição resultantes das triagens realizadas sobre os óleos essenciais e misturas foram avaliados através da análise de variância (ANOVA). As médias foram comparadas através do teste de Tukey, utilizando o pacote estatístico XLSTAT (Addinsoft, New York, EEUU). Considerou-se haver diferenças significativas dos diâmetros das zonas de inibição a um nível de confiança de 5% ($P < 0,05$).

Os diâmetros da zona de inibição foram também classificados de acordo com o critério de Djabou et al., (2013). Segundo este critério, os diâmetros menores ou iguais a 8,0 mm (-) caracterizam a bactéria como não sensível à ação antibacteriana do óleo essencial; para diâmetros entre 8,0 a 14,0 mm (+) como sensíveis moderadamente; para diâmetros entre 14,0 a 20,0 mm (++) como sensíveis e para diâmetros iguais ou maiores a 20 mm (+++) como a bactéria extremadamente sensível à ação do óleo.

Para os dados de diâmetro da zona de inibição obtidos na primeira triagem realizou-se também uma análise de componentes principais (ACP) e uma análise de agrupamento hierárquico (AAH).

2.3 Resultados

2.3.1 Atividade antimicrobiana

2.3.1.1 Triagem inicial

A triagem inicial dos óleos essenciais é sumarizada na Tabela 2.3. Os diâmetros da zona de inibição (DZI) dos óleos essenciais sobre as bactérias foram expresso em mm e avaliados quanto a diferenças significativas pelo teste de Tukey, com $P < 0,05$.

O teste de Tukey permitiu diferenciar os óleos essenciais em função dos diâmetros da zona de inibição apresentados por cada um, mostrando haver diferenças significativas da inibição dos óleos sobre as duas bactérias avaliadas. A aplicação do critério de Djabou et al., (2013) permitiu distinguir a sensibilidade das bactérias aos

óleos, mostrando que tanto a bactéria patogênica *S. Enteritidis* como a probiótica *L. plantarum* apresentaram-se desde extremamente sensíveis até não sensíveis aos diferentes óleos estudados.

A correlação da atividade antibacteriana dos vinte oito óleos essenciais sobre as duas bactérias modelos utilizadas na triagem, a patogênica *S. Enteritidis* e a probiótica *L. plantarum*, a partir da análise de componentes principais (PCA) das médias dos valores do diâmetro da zona de inibição (Fig. 1), mostrou que o eixo horizontal explicou 93,41% da variância total dos resultados obtidos, enquanto que o eixo vertical os outros 6,49% restante (Fig. 1). Portanto, obteve-se uma boa representação dos dados da atividade antibacteriana dos óleos essenciais sobre ambas as bactérias.

A avaliação dos mesmos valores a partir da análise de agrupamento hierárquico (HCA), com base nas distâncias Euclidianas entre grupos, indicou que os óleos essenciais foram distribuídos nos grupos A, B, C, D e E (Fig. 1), de acordo com sua atividade antibacteriana sobre as duas bactérias modelos com uma dissimilaridade $\leq 0,85$. Este agrupamento também foi observado no PCA, sendo que o primeiro eixo principal separou os grupos A e B dos grupos C, D e E, mostrando que ambos grupos apresentam uma atividade antibacteriana muito diferenciada em relação aos outros três grupos sobre as duas bactérias avaliadas.

Tabela 2.3 - Atividade antimicrobiana de 28 óleos essenciais sobre a bactéria patógena *Salmonella* Enteritidis e sobre a bactéria probiótica *Lactobacillus plantarum**

Micro-organismos		<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076				<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014			
Nº	Óleos essenciais	DZI ¹	CP ¹	% I	CN	DZI	CP	% I	CN
1	<i>Lippia sidóides</i>	34,7 ± 3,0 ^a (+++)	18,0 ± 0,5 ^{ab} (++)	192,9	NA	37,8 ± 3,3 ^a (+++)	10,1 ± 4,2 ^a (+)	374,7	NA
2	<i>Thymus vulgaris</i>	29,8 ± 3,1 ^b (+++)	17,7 ± 1,0 ^{ab} (++)	168,6	NA	26,7 ± 0,8 ^b (+++)	7,6 ± 2,7 ^a (-)	352,4	NA
3	Citrus Terpens	17,7 ± 1,9 ^c (++)	18,0 ± 2,0 ^{ab} (++)	98,1	NA	7,6 ± 0,1 ^{de} (-)	6,4 ± 0,7 ^a (-)	118,4	NA
4	<i>Eucalyptus globulus</i>	16,4 ± 0,5 ^{cd} (++)	18,0 ± 0,5 ^{ab} (++)	91,2	NA	8,1 ± 0,5 ^{de} (+)	6,0 ^a (-)	134,4	NA
5	Orange oil phase essence	16,2 ± 0,4 ^{cd} (++)	17,8 ± 1,5 ^{ab} (++)	91,0	NA	7,2 ± 0,6 ^{de} (-)	6,5 ± 0,9 ^a (-)	109,8	NA
6	<i>Eucalyptus exserta</i>	14,4 ± 0,6 ^{cde} (++)	17,7 ± 0,3 ^{ab} (++)	81,4	NA	7,1 ± 0,2 ^{de} (-)	6,5 ± 0,9 ^a (-)	109,5	NA
7	<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	13,7 ± 0,3 ^{def} (+)	17,6 ± 0,5 ^{ab} (++)	71,6	NA	8,4 ± 0,2 ^{de} (+)	6,0 ^a (-)	140,0	NA
8	<i>Eucalyptus urograndis</i>	13,1 ± 1,3 ^{def} (+)	17,8 ± 1,5 ^{ab} (++)	73,2	NA	14,0 ± 3,3 ^c (++)	6,0 ^a (-)	233,1	NA
9	<i>Cymbopogon citratus</i>	12,1 ± 2,0 ^{efg} (+)	15,3 ± 0,3 ^b (++)	78,6	NA	9,6 ± 0,8 ^d (+)	7,8 ± 1,7 ^a (-)	123,6	NA
10	<i>Eucalyptus grandis</i>	10,6 ± 1,8 ^{efgh} (+)	19,5 ± 1,3 ^a (++)	54,4	NA	13,2 ± 1,0 ^c (+)	6,0 ^a (-)	220,7	NA
11	Thaiti lime peel oil	10,2 ± 0,9 ^{fghi} (+)	17,5 ± 2,3 ^{ab} (++)	58,1	NA	6,8 ± 1,0 ^{de} (-)	7,1 ± 1,0 ^a (-)	96,0	NA
12	<i>Eucalyptus staigeriana</i>	8,8 ± 0,7 ^{ghij} (+)	18,5 ± 1,3 ^{ab} (++)	47,4	NA	7,3 ± 0,3 ^{de} (-)	8,8 ± 2,6 ^a (+)	82,9	NA
13	<i>Zingiber officinale</i>	8,8 ± 1,5 ^{ghij} (+)	18,2 ± 0,6 ^{ab} (++)	48,3	NA	7,0 ± 0,9 ^{de} (-)	6,9 ± 1,5 ^a (-)	101,5	NA
14	<i>Melaleuca alternifolia</i>	8,1 ± 0,8 ^{hij} (+)	16,3 ± 1,8 ^{ab} (++)	49,7	NA	6,1 ± 0,2 ^e (-)	6,0 ^a (-)	101,7	NA
15	Orange peel oil	7,7 ± 2,2 ^{hij} (-)	18,2 ± 1,2 ^{ab} (++)	42,5	NA	6,0 ^e (-)	6,9 ± 1,6 ^a (-)	87,0	NA
16	<i>Mintostachys mollis</i>	7,6 ± 0,3 ^{hij} (-)	16,7 ± 0,8 ^{ab} (++)	45,7	NA	7,6 ± 0,6 ^{de} (-)	9,5 ± 1,5 ^a (+)	79,6	NA
17	Oil five fold	7,6 ± 0,6 ^{hij} (-)	18,3 ± 1,0 ^{ab} (++)	41,2	NA	6,0 ^e (-)	6,0 ^a (-)	100,0	NA
18	<i>Eucalyptus urophylla</i>	7,2 ± 0,2 ^{hij} (-)	18,2 ± 1,0 ^{ab} (++)	39,7	NA	6,0 ^e (-)	6,0 ^a (-)	100,0	NA
19	<i>Lippia alba</i>	7,2 ± 0,2 ^{hij} (-)	17,1 ± 1,5 ^{ab} (++)	42,2	NA	7,7 ± 0,5 ^{de} (-)	8,6 ± 2,8 ^a (+)	89,4	NA
20	<i>Melaleuca leucadendron</i>	7,1 ± 0,5 ^{hij} (-)	16,0 ± 0,9 ^{ab} (++)	44,4	NA	7,8 ± 0,1 ^{de} (-)	7,1 ± 1,1 ^a (-)	109,7	NA
21	Orange terpens	6,6 ± 0,5 ^{ij} (-)	18,5 ± 1,3 ^{ab} (++)	35,4	NA	6,7 ± 0,6 ^{de} (-)	7,1 ± 2,0 ^a (-)	93,3	NA
22	Thaiti lime oil phase	6,1 ± 0,2 ^j (-)	16,8 ± 1,9 ^{ab} (++)	36,3	NA	6,0 ^e (-)	7,0 ± 1,6 ^a (-)	86,3	NA
23	<i>Baccharis dracunculifolia</i>	6,0 ⁱ (-)	17,3 ± 0,3 ^{ab} (++)	34,6	NA	7,1 ± 0,1 ^{de} (-)	6,0 ^a (-)	118,3	NA
24	<i>Corymbia citriodora</i>	6,0 ⁱ (-)	16,8 ± 0,6 ^{ab} (++)	35,6	NA	8,0 ± 0,1 ^{de} (-)	7,4 ± 2,4 ^a (-)	108,0	NA
25	<i>Cordia verbenacea</i>	6,0 ⁱ (-)	18,5 ± 1,3 ^{ab} (++)	32,4	NA	7,6 ± 0,3 ^{de} (-)	7,5 ± 1,4 ^a (-)	101,9	NA
26	<i>Eucalyptus crebra</i>	6,0 ⁱ (-)	18,2 ± 1,9 ^{ab} (++)	33,0	NA	7,5 ± 0,3 ^{de} (-)	6,5 ± 0,8 ^a (-)	116,5	NA
27	<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	6,0 ⁱ (-)	17,5 ± 0,0 ^{ab} (++)	34,3	NA	8,0 ± 0,6 ^{de} (-)	6,3 ± 0,5 ^a (-)	127,1	NA
28	Thaiti lime water	6,0 ⁱ (-)	18,5 ± 2,3 ^{ab} (++)	32,4	NA	6,0 ^e (-)	6,5 ± 0,9 ^a (-)	92,1	NA

* DZI: Diâmetro da zona de inibição; CP: Controle positivo (estreptomicina); %I: Inibição do óleo essencial em relação CP; CN: Controle negativo (Acetona); NA: não teve atividade antibacteriana.

¹ Valores das médias ± desvio padrão de três repetições expressados em mm.

a-j: valores dentro de uma coluna com diferentes expoentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Os óleos essenciais foram classificados como: (+++) sensibilidade extrema, (++) sensíveis, (+) sensível moderadamente, (-) não sensível.

Figura 2.1 - (A) Análises de componentes principais e (B) Análises de agrupamento hierárquico dos óleos essenciais em função de sua atividade antibacteriana sobre *Salmonella* Enteritidis e *Lactobacillus plantarum*

O grupo A foi constituído pelo óleo essencial de *Lippia sidoides*, sendo a *S. Enteritidis* e o *L. plantarum* extremamente sensíveis à sua ação. Este óleo essencial apresentou a maior inibição sobre as duas bactérias em comparação aos demais óleos essenciais sendo esta inibição inclusive superior à produzida pela estreptomicina. A inibição relativa com base ao antibiótico estreptomicina, para ambas as bactérias, foi de 192,9% e 374,7%, respectivamente. Contudo, uma maior ação inibitória sobre a bactéria probiótica ($37,8 \pm 3,3$ mm) do que a bactéria patogênica ($34,7 \pm 3,0$ mm) foi também observada para este óleo essencial, indicando que o grupo A não foi seletivo sobre a bactéria probiótica *L. plantarum*.

O grupo B foi constituído pelo óleo de *Thymus vulgaris*. Dentre os óleos avaliados este apresentou a segunda maior inibição para ambas as bactérias sendo observados halos de inibição de $29,8 \pm 3,1$ mm para *S. Enteritidis* e de $26,7 \pm 0,8$ mm para *L. plantarum*.

O grupo C foi constituído pelos óleos essenciais de Citrus Terpens, *Eucalyptus globulus*, Orange Oil Phase Essence, *Eucalyptus exserta*, *Pimenta pseudocaryophyllus* e *Cymbopogon citratus*. Este grupo de óleos essenciais caracterizou-se por ser mais ativo contra a *S. Enteritidis* e menos ativo sobre o *L. plantarum*, podendo-se assim notar uma seletividade desses óleos essenciais, o que proporcionou menor ação antibacteriana sobre a bactéria probiótica. O óleo de *C. citratus* apesar de seguir a característica do grupo se diferenciou dos demais óleos em relação a ambas as bactérias ($P < 0,05$), já que exerceu a mais baixa atividade antibacteriana do grupo sobre a *S. Enteritidis* e a mais alta atividade antibacteriana do grupo sobre o *L. plantarum* (Tabela 2.3). A sensibilidade do *L. plantarum* aos demais óleos deste grupo foi variável, assim aos óleos de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* ela foi moderadamente sensível (+). Já aos óleos de Citrus Terpens, Orange Oil Phase Essence e *E. exserta* foi não sensível (-). A *S. Enteritidis* foi sensível (++) aos óleos de Citrus Terpens, *E. globulus*, Orange Oil Phase Essence e *E. exserta*, e moderadamente sensível (+) à ação da *P. pseudocaryophyllus*. A inibição sobre a *S. Enteritidis* proporcionada através dos óleos deste grupo foi no mínimo 71,6% da inibição observada pelo controle positivo (estreptomicina).

O grupo D, foi representado pelos óleos de *Eucalyptus urograndis* e *Eucalyptus grandis*. Este grupo caracterizou-se por ser mais antibacteriano sobre o *L. plantarum* do que a *S. Enteritidis*. Notou-se que o *L. plantarum* foi sensível (++) ou moderadamente sensível (+) à ação destes óleos essenciais e a *S. Enteritidis* foi só

modernamente sensível (+) à ação deles. Depois da *L. sidoides* e *T. vulgaris*, este grupo foi o mais ativo sobre o *L. plantarum* (Tabela 2.3).

O grupo E foi o grupo composto por um maior número de óleos essenciais, os quais foram Thaiti Lime Peel Oil, *Eucalyptus staigeriana*, *Zingiber officinale*, *Melaleuca alternifolia*, Orange Peel Oil, *Mintostachys mollis*, Oil Five Fold, *Eucalyptus urophylla*, *Lippia alba*, *Melaleuca leucadendron*, Orange Terpens, Thaiti Lime Oil Phase, *Baccharis dracunculifolia*, *Corymbia citriodora*, *Cordia verbenacea*, *Eucalyptus crebra*, *Eucalyptus camaldulensis* e Thaiti Lime Water. Este grupo, caracterizou-se por apresentar a menor atividade antibacteriana sobre *S. Enteritidis* e também sobre o *L. plantarum*, tendo mostrado menores diâmetros da zona de inibição ou não apresentando inibição nenhuma para ambas bactérias (6 mm indica o diâmetro do disco onde foi colocado o óleo essencial). Os óleos deste grupo apresentaram sobre a *S. Enteritidis* uma inibição inferior a 58% ao proporcionado pela estreptomicina. Sobre o *L. plantarum* a inibição foi superior ao observado para o antibiótico sintético.

Os óleos agrupados no grupo C, a exceção do óleo de *C. citratus*, foram escolhidos para prosseguir no estudo, devido à seletividade apresentada e à reduzida ação antibacteriana sobre o *L. plantarum*. O óleo de *C. citratus* foi excluído do grupo uma vez que, exerceu uma maior atividade antibacteriana sobre o *L. plantarum*, sendo estatisticamente diferente ($P < 0,05$) aos outros cinco óleos essenciais do grupo.

2.3.1.2 Estudo sobre os óleos selecionados

Os resultados da atividade antibacteriana dos óleos essenciais selecionados Citrus Terpens, *Eucalyptus globulus*, Orange Oil Phase Essence, *E. exserta* e *P. pseudocaryophyllus*, avaliados individualmente e em misturas binárias são apresentados na Tabela 2.4.

O óleo essencial Orange Oil Phase Essence individualmente destacou-se por exercer uma maior atividade antibacteriana sobre a maior quantidade de bactérias patogênicas e uma menor atividade antibacteriana sobre a maior quantidade de bactérias probióticas ($P < 0,05$), em comparação aos demais óleos e/ou misturas avaliadas (Tabela 2.4). O Orange Oil Phase Essence caracterizou-se por exercer a maior ação antibacteriana sobre *S. aureus* e *E. coli* ($P < 0,05$), sendo estas bactérias extremadamente sensíveis (+++) à atividade antibacteriana deste óleo essencial, pois apresentaram diâmetros da zona de inibição de $28,4 \pm 1,9$ mm e $27,1 \pm 2,3$ mm,

respectivamente (Tabela 2.4). Do mesmo modo, a *S. Enteritidis* foi sensível (++) e a *L. innocua* moderadamente sensível (+) a este óleo essencial. Contudo, somente o *E. faecalis* não mostrou sensibilidade frente a este óleo. Em relação às bactérias probióticas, o Orange Oil Phase Essence exerceu uma fraca inibição sobre o *L. rhamnosus* ($8,4 \pm 0,3$ mm) e *L. plantarum* ($7,2 \pm 0,6$ mm), sendo esta última não sensível (-) a este óleo. No caso da bactéria probiótica *B. subtilis*, o Orange Oil Phase Essence foi fortemente ativo sobre ela.

A segunda maior inibição sobre as bactéria em geral foi proporcionada pelo óleo Citrus Terpens e as misturas M8 e M10. Porém, as misturas M8 e M10 foram compostas por um ou ambos os óleos essenciais Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpens, e as misturas não mostraram um desempenho superior a estes óleos individualmente. O óleo essencial Citrus Terpens, apresentou uma boa atividade antibacteriana sobre *S. aureus* e *E. coli*, pois elas foram sensíveis a este óleo (++) com DZI de $19,3 \pm 1,0$ mm e $17,9 \pm 0,4$; respectivamente. Este óleo produziu a maior inibição ($P < 0,05$) da *S. Enteritidis*, DZI igual a $17,7 \pm 1,9$ mm. Tanto *L. innocua* e *E. faecalis* mostraram ser moderadamente sensíveis (+) ao Citrus Terpens. No caso do *L. plantarum* e *L. rhamnosus*, uma fraca inibição também foi observada para este óleo DZIs igual $7,6 \pm 0,1$ mm e $8,7 \pm 0,4$ mm, respectivamente, igual ao observado para o Orange Oil Phase Essence. O *B. subtilis* mostrou-se também ser bastante inibida pelo Citru Terpens, DZI de $19,4 \pm 1,0$ mm.

Portanto, os resultados ratificaram a ação inibitória e a seletividade do Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpens, sobre bactérias patogênicas e probióticas já observada na triagem inicial, e mostraram que estes dois óleos apresentaram os desempenhos mais apropriados aos objetivos deste estudo entre os óleos essenciais e as misturas avaliadas. Assim, foram os dois óleos de melhor desempenho antibacteriano seletivo.

Tabela 2.4 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais selecionados e suas misturas binárias sobre bactérias patogênicas e bactérias probióticas*

Micro-organismo	<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923				<i>Listeria innocua</i> ATCC 33090				<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 29212			
Óleo essencial / Mistura	DZI ¹	CP ¹	% I	CN	DZI	CP	% I	CN	DZI	CP	% I	CN
<i>Eucalyptus globulos</i>	24,7 ± 0,7 ^b (+++)	18,7 ± 0,6 ^{ab} (++)	132,4	NA ⁶	9,8 ± 1,5 ^{bcd} (+)	18,0 ± 0,7 ^b (++)	54,5	NA ⁶	7,7 ± 0,3 ^{abc} (-)	8,0 ± 0,7 ^b (-)	95,6	NA ⁶
<i>Eucalyptus exserta</i>	15,1 ± 0,2 ^{de} (++)	17,9 ± 1,4 ^{ab} (++)	84,3	NA	7,6 ± 0,4 ^e (-)	20,1 ± 1,4 ^{ab} (+++)	37,3	NA	6,7 ± 0,2 ^{cd} (-)	11,0 ± 0,4 ^a (+)	61,3	NA
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	12,2 ± 1,4 ^{efg} (+)	18,8 ± 1,0 ^{ab} (++)	65,2	NA	10,6 ± 0,5 ^{bcd} (+)	20,2 ± 1,3 ^{ab} (+++)	52,7	NA	8,5 ± 0,4 ^a (+)	6,0 ± 0,0 ^b (-)	141,8	NA
Orange oil phase essence	28,4 ± 1,9 ^a (+++)	18,1 ± 0,6 ^{ab} (++)	157,0	NA	11,5 ± 1,1 ^{ab} (+)	18,9 ± 1,5 ^{ab} (++)	60,5	NA	7,6 ± 0,2 ^{abc} (-)	7,4 ± 0,2 ^b (-)	104,0	NA
Citrus Terpens	19,3 ± 1,0 ^c (++)	16,7 ± 0,8 ^b (++)	115,2	NA	12,0 ± 0,1 ^{ab} (+)	19,4 ± 1,2 ^{ab} (++)	61,9	NA	8,1 ± 0,8 ^{ab} (+)	10,8 ± 0,8 ^a (+)	74,3	NA
M1**	10,1 ± 0,5 ^g (+)	17,7 ± 0,1 ^{ab} (++)	57,4	NA	8,3 ± 0,3 ^{cde} (+)	20,2 ± 1,3 ^{ab} (+++)	41,0	NA	6,9 ± 0,2 ^{bcd} (-)	6,0 ± 0,0 ^b (-)	114,5	NA
M2	15,1 ± 1,3 ^{de} (++)	18,5 ± 0,8 ^{ab} (++)	81,2	NA	12,2 ± 1,5 ^{ab} (+)	21,3 ± 1,1 ^{ab} (+++)	57,1	NA	7,8 ± 0,1 ^{abc} (-)	7,1 ± 1,0 ^b (-)	110,7	NA
M3	12,5 ± 0,7 ^{efg} (+)	19,1 ± 1,2 ^a (++)	65,7	NA	10,0 ± 1,1 ^{bcd} (+)	19,4 ± 1,3 ^{ab} (++)	51,8	NA	7,1 ± 0,4 ^{bcd} (-)	6,0 ± 0,0 ^b (-)	118,0	NA
M4	12,1 ± 0,7 ^{fg} (+)	18,4 ± 0,4 ^{ab} (++)	65,9	NA	10,9 ± 0,9 ^{bcd} (+)	18,7 ± 1,5 ^{ab} (++)	58,3	NA	7,7 ± 0,7 ^{abc} (-)	6,0 ± 0,0 ^b (-)	128,0	NA
M5	14,0 ± 0,6 ^{def} (++)	18,5 ± 0,8 ^{ab} (++)	75,9	NA	8,2 ± 0,5 ^{de} (+)	18,9 ± 2,1 ^{ab} (++)	43,3	NA	7,8 ± 0,4 ^{abc} (-)	7,3 ± 1,1 ^b (-)	108,1	NA
M6	12,6 ± 0,4 ^{defg} (+)	19,1 ± 0,7 ^a (++)	66,0	NA	10,5 ± 1,1 ^{bcd} (+)	20,8 ± 0,7 ^{ab} (+++)	50,4	NA	6,0 ± 0,0 ^d (-)	7,3 ± 1,1 ^b (-)	82,2	NA
M7	13,0 ± 0,4 ^{defg} (+)	18,2 ± 0,5 ^{ab} (++)	71,1	NA	12,0 ± 0,5 ^{ab} (+)	22,3 ± 0,7 ^a (+++)	54,0	NA	7,3 ± 0,4 ^{abc} (-)	6,8 ± 1,3 ^b (-)	108,5	NA
M8	12,5 ± 1,1 ^{efg} (+)	19,4 ± 0,6 ^a (++)	64,2	NA	14,1 ± 1,6 ^a (++)	17,6 ± 1,5 ^b (++)	80,1	NA	7,6 ± 0,5 ^{abc} (-)	8,3 ± 0,3 ^b (+)	92,4	NA
M9	13,4 ± 0,9 ^{def} (+)	18,8 ± 0,6 ^{ab} (++)	71,4	NA	11,0 ± 0,3 ^{bc} (+)	19,4 ± 0,2 ^{ab} (++)	56,8	NA	7,9 ± 0,2 ^{abc} (-)	6,9 ± 0,8 ^b (-)	115,3	NA
M10	15,4 ± 0,8 ^d (++)	18,9 ± 0,2 ^{ab} (++)	81,8	NA	11,8 ± 0,3 ^{ab} (+)	20,9 ± 0,9 ^{ab} (+++)	56,6	NA	7,7 ± 0,6 ^{abc} (-)	6,8 ± 1,3 ^b (-)	113,4	NA

* DZI: Diâmetro da zona de inibição; CP: Controle positivo (estreptomicina); %I: Inibição do óleo essencial em relação CP; CN: Controle negativo (Acetona); NA: não teve atividade antibacteriana.

** M1: *Eucalyptus globulus* + *Eucalyptus exserta*; M2: *Eucalyptus globulus* + *Pimenta pseudocaryophyllus*; M3: *Eucalyptus globulus* + *Product orange oil phase essence*; M4: *Eucalyptus globulus* + *Product citrus terpens*; M5: *Eucalyptus exserta* + *Pimenta pseudocaryophyllus*; M6: *Eucalyptus exserta* + *Product orange oil phase essence*; M7: *Eucalyptus exserta* + *Product citrus terpens*; M8: *Pimenta pseudocaryophyllus* + *Product orange oil phase essence*; M9: *Pimenta pseudocaryophyllus* + *Product citrus terpens*; M10: *Product orange oil phase essence* + *Product citrus terpens*.

¹ Valores das médias ± desvio padrão de três repetições expressados em mm.

a-j: valores dentro de uma coluna com diferentes expoentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Os óleos essenciais foram classificados como: (+++) sensibilidade extrema, (++) sensíveis, (+) sensível moderadamente, (-) não sensível.

Tabela 2.4 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais selecionados e suas misturas binárias sobre bactérias patogênicas e bactérias probióticas*.
Continuação

Micro-organismo	<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922				<i>Salmonella</i> Enteritidis ATCC 13076				<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6623			
Óleo essencial / Mistura	DZI ¹	CP ¹	% I	CN	DZI	CP	% I	CN	DZI	CP	% I	CN
<i>Eucalyptus globulos</i>	23,0 ± 0,9 ^b (+++)	16,0 ± 1,9 ^a (++)	143,6	NA ⁶	16,4 ± 0,5 ^{abc} (++)	18,0 ± 0,5 ^a (++)	91,2	NA ⁶	22,5 ± 1,2 ^b (+++)	17,8 ± 0,3 ^{abc} (++)	126,4	NA ⁶
<i>Eucalyptus exserta</i>	16,2 ± 0,9 ^{efg} (++)	16,9 ± 0,9 ^a (++)	95,6	NA	14,4 ± 0,6 ^{bcd} (++)	17,7 ± 0,3 ^a (++)	81,4	NA	15,9 ± 0,1 ^{efg} (++)	17,5 ± 2,4 ^{abcde} (++)	83,9	NA
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	13,4 ± 0,4 ^h (++)	18,0 ± 1,1 ^a (++)	74,5	NA	13,7 ± 0,3 ^{cd} (+)	17,6 ± 0,5 ^a (++)	71,6	NA	11,8 ± 0,1 ⁱ (+)	14,0 ± 0,8 ^{de} (++)	84,7	NA
Orange oil phase essence	27,1 ± 2,3 ^a (+++)	18,3 ± 0,6 ^a (++)	148,5	NA	16,2 ± 0,4 ^{abc} (++)	17,8 ± 1,5 ^a (++)	91,0	NA	27,9 ± 1,5 ^a (+++)	19,7 ± 1,2 ^a (++)	141,2	NA
Citrus Terpens	17,9 ± 0,4 ^{def} (++)	19,1 ± 0,9 ^a (++)	94,0	NA	17,7 ± 1,9 ^a (++)	18,0 ± 2,0 ^a (++)	98,1	NA	19,4 ± 1,0 ^c (++)	19,2 ± 1,2 ^{ab} (++)	101,4	NA
M1**	19,3 ± 0,3 ^{cd} (++)	17,1 ± 0,7 ^a (++)	113,0	NA	16,6 ± 0,8 ^{ab} (++)	19,3 ± 0,7 ^a (++)	85,8	NA	18,0 ± 0,7 ^{cde} (++)	16,1 ± 1,8 ^{abcde} (++)	112,0	NA
M2	16,5 ± 0,8 ^{efg} (++)	17,4 ± 0,2 ^a (++)	95,0	NA	17,2 ± 1,3 ^{ab} (++)	19,5 ± 0,9 ^a (++)	87,9	NA	14,6 ± 0,5 ^{ghi} (+)	15,1 ± 1,2 ^{cde} (++)	96,6	NA
M3	26,3 ± 0,8 ^a (+++)	18,4 ± 0,3 ^a (++)	142,8	NA	16,7 ± 0,5 ^{ab} (++)	18,7 ± 0,7 ^a (++)	89,5	NA	21,9 ± 1,0 ^b (+++)	13,8 ± 1,7 ^e (+)	158,2	NA
M4	18,8 ± 1,1 ^{de} (++)	17,8 ± 1,4 ^a (++)	105,8	NA	16,1 ± 1,3 ^{abc} (++)	17,5 ± 2,3 ^a (++)	92,3	NA	18,3 ± 0,4 ^{cd} (++)	16,6 ± 0,8 ^{abcde} (++)	110,2	NA
M5	14,1 ± 0,4 ^{gh} (++)	16,7 ± 2,1 ^a (++)	84,1	NA	12,9 ± 0,3 ^d (+)	19,2 ± 0,6 ^a (++)	67,0	NA	12,4 ± 0,8 ^{ij} (+)	15,3 ± 0,8 ^{cde} (++)	80,9	NA
M6	22,7 ± 0,5 ^b (+++)	16,3 ± 1,9 ^a (++)	139,2	NA	13,0 ± 1,5 ^d (+)	19,6 ± 1,2 ^a (++)	66,3	NA	17,1 ± 0,3 ^{def} (++)	15,6 ± 1,3 ^{bcde} (++)	109,4	NA
M7	18,2 ± 0,5 ^{def} (++)	15,8 ± 2,5 ^a (++)	115,3	NA	13,1 ± 0,4 ^d (+)	18,8 ± 0,4 ^a (++)	69,5	NA	15,3 ± 0,7 ^{fg} (++)	17,5 ± 1,0 ^{abcde} (++)	87,4	NA
M8	16,2 ± 0,5 ^{efg} (++)	17,5 ± 1,0 ^a (++)	92,9	NA	17,0 ± 1,0 ^{ab} (++)	19,6 ± 0,2 ^a (++)	86,4	NA	12,7 ± 0,6 ^{hij} (+)	16,0 ± 0,6 ^{bcde} (++)	79,2	NA
M9	15,7 ± 0,8 ^{fgh} (++)	17,3 ± 0,6 ^a (++)	91,2	NA	15,0 ± 0,3 ^{bcd} (++)	20,0 ± 0,5 ^a (+++)	74,9	NA	14,7 ± 0,8 ^{gh} (++)	17,6 ± 0,9 ^{abcd} (++)	83,6	NA
M10	21,6 ± 0,7 ^{bc} (+++)	17,3 ± 1,3 ^a (++)	124,7	NA	14,8 ± 0,8 ^{bcd} (++)	20,1 ± 0,7 ^a (+++)	73,5	NA	18,3 ± 0,5 ^{cd} (++)	18,3 ± 0,9 ^{abc} (++)	100,4	NA

* DZI: Diâmetro da zona de inibição; CP: Controle positivo (estreptomicina); %I: Inibição do óleo essencial em relação CP; CN: Controle negativo (Acetona); NA: não teve atividade antibacteriana.

** M1: *Eucalyptus globulus* + *Eucalyptus exserta*; M2: *Eucalyptus globulus* + *Pimenta pseudocaryophyllus*; M3: *Eucalyptus globulus* + *Product orange oil phase essence*; M4: *Eucalyptus globulus* + *Product citrus terpens*; M5: *Eucalyptus exserta* + *Pimenta pseudocaryophyllus*; M6: *Eucalyptus exserta* + *Product orange oil phase essence*; M7: *Eucalyptus exserta* + *Product citrus terpens*; M8: *Pimenta pseudocaryophyllus* + *Product orange oil phase essence*; M9: *Pimenta pseudocaryophyllus* + *Product citrus terpens*; M10: *Product orange oil phase essence* + *Product citrus terpens*.

¹ Valores das médias ± desvio padrão de três repetições expressados em mm.

a-j: valores dentro de uma coluna com diferentes expoentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P <0,05).

Os óleos essenciais foram classificados como: (+++) sensibilidade extrema, (++) sensíveis, (+) sensível moderadamente, (-) não sensível.

Tabela 2.4 - Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais selecionados e suas misturas binárias sobre bactérias patógenas e bactérias probióticas*. **Continuação**

Micro-organismo	<i>Lactobacillus plantarum</i> ATCC 8014				<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469			
	Óleo essencial / Mistura	DZI ¹	CP ¹	% I	CN	DZI	CP	% I
<i>Eucalyptus globulos</i>	8,1 ± 0,5 ^{ab (+)}	6,0 ^{b (-)}	134,4	NA ⁶	9,4 ± 0,5 ^{b (+)}	14,1 ± 1,5 ^{a (++)}	66,7	NA ⁶
<i>Eucalyptus exserta</i>	7,1 ± 0,2^{bc (-)}	6,5 ± 0,9 ^{ab (-)}	109,5	NA	7,0 ± 0,0^{g (-)}	11,4 ± 1,1 ^{abc (+)}	61,4	NA
<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>	8,4 ± 0,2 ^{a (+)}	6,0 ^{b (-)}	140,0	NA	11,4 ± 0,4 ^{a (+)}	9,7 ± 0,5 ^{cd (+)}	117,2	NA
Orange oil phase essence	7,2 ± 0,6^{bc (-)}	6,5 ± 0,9 ^{ab (-)}	109,8	NA	8,4 ± 0,3 ^{cde (+)}	13,3 ± 2,5 ^{ab (+)}	63,0	NA
Citrus Terpens	7,6 ± 0,1^{abc (-)}	6,4 ± 0,7 ^{ab (-)}	118,4	NA	8,7 ± 0,4 ^{bcd (+)}	14,5 ± 0,4 ^{a (++)}	60,1	NA
M1 ^{**}	7,2 ± 0,1^{bc (-)}	6,0 ± 0,0 ^{b (-)}	119,2	NA	7,5 ± 0,2^{fg (-)}	9,3 ± 0,5 ^{cd (+)}	80,5	NA
M2	8,0 ± 0,1^{abc (-)}	6,0 ± 0,0 ^{b (-)}	132,6	NA	7,9 ± 0,2 ^{defg (-)}	9,7 ± 1,1 ^{cd (+)}	81,5	NA
M3	7,0 ± 0,1^{c (-)}	6,0 ± 0,0 ^{b (-)}	116,9	NA	7,8 ± 0,2^{efg (-)}	7,7 ± 1,6 ^{d (-)}	100,5	NA
M4	7,4 ± 0,2^{bc (-)}	6,0 ± 0,0 ^{b (-)}	123,5	NA	7,6 ± 0,1^{efg (-)}	8,5 ± 0,6 ^{cd (+)}	89,0	NA
M5	7,8 ± 0,2^{abc (-)}	6,0 ± 0,0 ^{b (-)}	129,3	NA	8,3 ± 0,4 ^{cdef (+)}	10,2 ± 0,3 ^{bcd (+)}	81,1	NA
M6	8,1 ± 0,7 ^{ab (+)}	6,0 ± 0,0 ^{b (-)}	134,2	NA	7,5 ± 0,3^{fg (-)}	11,0 ± 0,9 ^{abcd (+)}	67,8	NA
M7	7,7 ± 0,2^{abc (-)}	6,8 ± 0,7 ^{ab (-)}	112,5	NA	7,2 ± 0,1^{g (-)}	9,1 ± 1,9 ^{cd (+)}	79,1	NA
M8	7,9 ± 0,1^{abc (-)}	7,5 ± 0,6 ^{a (-)}	104,6	NA	8,8 ± 0,3 ^{bc (+)}	9,1 ± 1,2 ^{cd (+)}	97,3	NA
M9	7,8 ± 0,2^{abc (-)}	6,0 ± 0,0 ^{b (-)}	130,7	NA	7,6 ± 0,0^{efg (-)}	10,3 ± 0,2 ^{bcd (+)}	73,9	NA
M10	7,9 ± 0,3^{abc (-)}	7,0 ± 0,9 ^{ab (-)}	113,4	NA	7,7 ± 0,6^{efg (-)}	9,2 ± 0,2 ^{cd (+)}	83,9	NA

* DZI: Diâmetro da zona de inibição; CP: Controle positivo (estreptomicina); %I: Inibição do óleo essencial em relação CP; CN: Controle negativo (Acetona); NA: não teve atividade antibacteriana.

** M1: *Eucalyptus globulus* + *Eucalyptus exserta*; M2: *Eucalyptus globulus* + *Pimenta pseudocaryophyllus*; M3: *Eucalyptus globulus* + *Product orange oil phase essence*; M4: *Eucalyptus globulus* + *Product citrus terpens*; M5: *Eucalyptus exserta* + *Pimenta pseudocaryophyllus*; M6: *Eucalyptus exserta* + *Product orange oil phase essence*; M7: *Eucalyptus exserta* + *Product citrus terpens*; M8: *Pimenta pseudocaryophyllus* + *Product orange oil phase essence*; M9: *Pimenta pseudocaryophyllus* + *Product citrus terpens*; M10: *Product orange oil phase essence* + *Product citrus terpens*.

¹ Valores das médias ± desvio padrão de três repetições expressados em mm.

a-j: valores dentro de uma coluna com diferentes expoentes são significativamente diferentes pelo teste de Tukey (P < 0,05).

Os óleos essenciais foram classificados como: (+++) sensibilidade extrema, (++) sensíveis, (+) sensível moderadamente, (-) não sensível.

Nesse sentido, foi analisada a composição química destes dois óleos de melhor desempenho, Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpens, a qual, é apresentada na Tabela 2.5. Nesta tabela observa-se que, o Limoneno foi detectado como composto majoritário de ambos óleos essenciais, representando 87,22% e 28,67%, respectivamente. Como uma mesma atividade antibacteriana seletiva sobre bactérias patogênicas e probióticas foi observada tanto para o Orange Oil Phase Essence como para o Citrus Terpens, e houve uma diferente quantidade de Limoneno presente em cada óleo essencial, é provável que o mesmo perfil antibacteriano possa ser resultado da ação dos compostos minoritários presentes em cada óleo.

Tabela 2.5 - Composição química dos dois melhores óleos essenciais

Compostos ¹	TR ²	IK ³	Citrus Terpens (%) ⁴	Orange Oil Phase Essence (%) ⁴
Mirceno	10.390	996	-	1,47
Limoneno	11.725	1033	28,67	87,22
Óxido de <i>cis</i> -limoneno	15.498	1139	-	3,59
Óxido de <i>trans</i> -limoneno	15.658	1143	1,73	1,96
Santolina trieno	17.741	1202	1,36	-
N.I	17.866	1206	2,25	-
<i>trans</i> -Carveol (E-Carveol)	18.542	1225	8,82	1,17
<i>cis</i> -Carveol (Z-Carveol)	18.950	1237	2,55	-
Carvona	19.425	1251	14,58	-
Óxido de carvona, <i>cis</i>	20.600	1285	1,34	-
Dióxido de limoneno	21.158	1302	4,25	-
Verbenol	21.575	1315	-	1,17
p-mentha-E-2,8(9)-dien-1-ol	22.009	1328	1,33	1,08
<i>cis</i> -Citral (Z-Citral)	22.384	1339	1,75	-
Limoneno-diol	22.642	1347	14,40	-
N.I	23.392	1370	3,90	1,26
8-hidroxi linalool	24.742	1412	8,11	-
N.I	25.958	1452	4,95	-
Valenceno	27.567	1504	-	1,08
Total			100,00	100,00

¹ Identificado por CG/MS

² Tempo de retenção obtido pela coluna capilar Rxi-5ms

³ Índices de Kovats calculados

⁴ Quantidades relativas dos compostos identificados com base na área de cada pico no cromatograma.

N.I: Composto no identificado

Embora nenhuma mistura tenha sido selecionada como a de melhor desempenho devido a que apresentaram uma menor atividade antibacteriana em comparação com os dois óleos cítricos, Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpens, estas misturas binárias obtidas a partir das combinações dos cinco óleos selecionados (avaliadas e apresentadas na Tabela 2.4), também foram avaliadas mediante a

determinação do efeito inibitório de cada mistura, apresentados na Tabela 2.6 e na Figura 2.2.

Tabela 2.6 - Efeito inibitório das misturas binárias dos óleos essenciais sobre bactérias patogênicas e probióticas

MO	<i>S. aureus</i> ATCC 25923	<i>L. innocua</i> ATCC 33090	<i>E. faecalis</i> ATCC 29212	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	<i>B. subtilis</i> ATCC 6623	<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	<i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469
M	IEI	IEI	IEI	IEI	IEI	IEI	IEI	IEI
M1	1,96 (A)*	1,05 (A)	1,05 (A)	1,02 (A)	0,93 (S)	1,07 (A)	1,06 (A)	1,10 (A)
M2	1,23 (A)	0,84 (S)	1,03 (A)	1,10 (A)	0,88 (S)	1,18 (A)	1,03 (A)	1,31 (A)
M3	2,12 (A)	1,06 (A)	1,08 (A)	0,95 (S)	0,98 (S)	1,15 (A)	1,08 (A)	1,14 (A)
M4	1,82 (A)	1,00 (Ad)	1,02 (A)	1,09 (A)	1,06 (A)	1,14 (A)	1,05 (A)	1,20 (A)
M5	0,97 (S)	1,11 (A)	0,97 (S)	1,05 (A)	1,09 (A)	1,12 (A)	1,00 (Ad)	1,11 (A)
M6	1,73 (A)	0,91 (S)	1,20 (A)	0,95 (S)	1,18 (A)	1,28 (A)	0,89 (S)	1,03 (A)
M7	1,32 (A)	0,82 (S)	1,01 (A)	0,93 (S)	1,23 (A)	1,16 (A)	0,96 (S)	1,09 (A)
M8	1,63 (A)	0,78 (S)	1,06 (A)	1,25 (A)	0,88 (S)	1,57 (A)	0,99 (S)	1,12 (A)
M9	1,17 (A)	1,03 (A)	1,04 (A)	1,00 (Ad)	1,05 (A)	1,06 (A)	1,02 (A)	1,33 (A)
M10	1,55 (A)	0,99 (S)	1,02 (A)	1,04 (A)	1,15 (A)	1,29 (A)	0,93 (S)	1,11 (A)

* Índice do efeito inibitório; Efeito inibitório: A = Antagonismo, Ad = Aditivo, I = Indiferente, S = Sinergismo.

Analisando-se os resultados da atividade inibitória das mistura sobre cada uma das bactérias avaliadas nesta etapa do estudo, foi possível observar uma efeito inibitório variável em função da mistura e da bactéria.

No caso do *S. aureus*, a mistura M5 foi a única que apresentou efeito sinérgico na inibição desta bactéria, sendo o IEI < 1 (0,97), estando a mistura localizada sob a linha aditiva do isolobograma (Fig. 2.2).

Para a bactéria *L. innocua*, o valor do IEI da mistura M8 foi igual a 0,78, o mais baixo em comparação as demais misturas, indicando o efeito sinérgico desta mistura na inibição da *L. innocua*. As misturas M2, M6, M7 e M10 também foram sinérgicas na inibição da desta bactéria. Um efeito aditivo foi observado para a M4 (IEI = 1).

Para o *E. faecalis* a M5 foi a única mistura que mostrou um efeito sinérgico (IEI = 0,97) na inibição desta bactéria, representada dentro da área sinérgica do isobolograma (Fig. 2.2).

No caso da *E. coli*, a mistura M3 mostrou o maior DZI sobre esta bactéria junto com o Orange Oil Phase Essence ($P < 0,05$) e o IEI para esta mistura foi 0,95, o que indicou um efeito sinérgico na inibição da *E. coli*. Além disso, as misturas M6 e M7 também apresentaram um efeito inibitório sinérgico (IEI < 1). Um efeito aditivo IEI = 1 foi observado pela M9.

Figura 2.2 - Isobogramas do perfil da interação das misturas de óleos essenciais sobre bactérias patogênicas e probióticas

As misturas M1, M2, M3, M4 e M8, apresentaram valores similares de DZIs ($P < 0,05$) sobre a *S. Enteritidis* entre si, mas diferentes em relação as demais misturas. Todas elas, a exceção da M4, foram sinérgicas na inibição desta bactéria ($IEI < 1$) em relação aos óleos individuais.

Todas as misturas foram antagônicas na inibição de *B. subtilis* e *L. rhamnosus* delas ($IEI > 1$). Para o *L. planatrum*, as M6, M7, M8 e M10 mostraram ter um efeito sinérgico na inibição desta bactéria (0,89; 0,96; 0,99 e 0,93; respectivamente) e a M5 mostrou ter um efeito aditivo $IEI = 1$.

Embora, poucas misturas exerceram um efeito sinérgico na inibição das algumas bactérias patogênicas, é importante destacar que as misturas em geral mostraram ser menos efetivas na inibição das bactérias probióticas do que os óleos individuais, inclusive sobre as duas bactérias probióticas que foram as mais sensíveis à ação dos óleos individuais, *B. subtilis* e *L. rhamnosus*, sendo possível que a interação dos óleos essenciais em cada mistura tenha diminuído a ação antibacteriana dos óleos sobre estas bactérias, mostrando antagonismo.

2.4 Discussão

Triagem inicial

A análise das atividades antibacterianas proporcionadas pelos 28 óleos essenciais através do PCA e HCA, mostraram o agrupamento destes em 5 grupos. Os grupos A e B apresentaram uma atividade bastante diferenciada em relação aos demais grupos. Estes grupos A e B, corresponderam aos óleos de *L. sidoides* e *T. vulgaris*, respectivamente. Estudos já observaram a efetividade do óleo de *L. sidoides* na inibição do crescimento de bactérias patogênicas como a *Staphylococcus aureus* (OLIVEIRA et al., 2006). A atividade antibacteriana da *L. sidoides* provavelmente se deve à presença do timol na sua composição química, composto que apresenta-se de forma majoritária neste óleo e possui reconhecida atividade antibacteriana (DOS SANTOS et al., 2015). O timol também é relatado como o composto majoritário no óleo essencial de *T. vulgaris* (NIKOLIC et al., 2014). Mancini et al. (2015) observaram que amostras deste óleo provenientes de diferentes locais foram eficazes na inibição de cinco bactérias gram-positivas (*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *S. aureus*,

S. epidermidis, *E. faecalis*) e cinco bactérias gram-negativas (*Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Typhi Ty2*), sendo as mais sensíveis à ação desses óleos as bactérias gram-positivas. Resultados similares já tinham sido encontrados também por Al-Bayati (2008), que reportaram maior sensibilidade das bactérias gram-positivas patogênicas *S. aureus* e *B. cereus* à ação antibacteriana do óleo de *T. vulgaris*. Johny et al. (2010) reportaram que o reduziu da população de *S. Enteritidis* no conteúdo cecal de frangos em uma avaliação *in vitro*, sugerindo que este composto possuía potencial para ser utilizado como aditivo por reduzir a colonização cecal por esta bactéria. Si et al. (2006) reportaram que o timol teve uma ação inibitória sobre bactérias patogênicas (*E. coli* O157:H7, *S. Typhimurium* DT104) do trato intestinal de suínos sem causar danos na microflora probiótica intestinal, formada por *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

Mancini et al. (2015) sugeriram que as bactérias gram-negativas são mais tolerantes a tratamentos com óleos essenciais, pelo fato de possuírem uma membrana externa hidrofílica que bloqueia a penetração dos óleos essenciais dentro da membrana celular bacteriana. Por outro lado, Helander et al. (1998) sugeriram que o composto majoritário destes óleos, o timol, possa ter uma ação sobre bactérias gram-negativas como *E. coli* e *S. Typhimurium*, pois desintegra a membrana externa dessas bactérias, causando a liberação dos lipopolissacarídeos dessa membrana para o meio exterior e ao mesmo tempo produz-se uma ação perturbadora na membrana citoplasmática pelo incremento da permeabilidade de ATP ao meio extracelular.

Os resultados obtidos em nosso estudo mostram que os óleos do grupo A e B, apresentaram uma ação inibitória forte sobre *S. Enteritidis* (gram-negativa) e *L. plantarum* (gram-positiva) demonstrando capacidade de podem afetar também a microflora probiótica que é fundamental para estimular o sistema imune dos animais (PATTERSON; BURKHOLDER, 2003).

Por outro lado, o grupo C, constituído por Citrus Terpens, *Eucalyptus globulos*, Orange Oil Phase Essence, *Eucalyptus exserta* e *Pimenta pseudocaryophyllus*, mostrou ser efetivo na inibição da *S. Enteritidis* e ter fraca inibição sobre o *L. plantarum*, sendo um grupo de óleos com seletividade entre bactérias probióticas e patogênicas. O óleo essencial de *E. globulus* é reportado na literatura como sendo rico em 1,8 cineol (eucaliptol), composto que é reconhecido pela sua atividade antimicrobiana sobre bactérias patogênicas (CIMANGA et al., 2002; MULYANINGSIH

et al., 2011) como a observada sobre a *S. Enteritidis* em nosso estudo. Existe poucos estudos sobre a atividade antimicrobiana de *E. exserta*. Elaissi et al. (2011) reportaram que o óleo de *E. exserta* foi caracterizado pela alta concentração de sesquiterpenos oxigenados (globulol, viridiflorol, espatulenol, α -eudesmol, β -eudesmol e cetona d-piperitona) e por uma baixa quantidade de monoterpenos oxigenados (1,8 cineol). Os mesmos autores reportaram a inatividade deste óleo na inibição de bactérias patogênicas gram-negativas. Porém, em nosso estudo a *S. Enteritidis*, uma bactéria gram-negativa, foi sensível a este óleo. Já os óleos essenciais de citros, Orange oil phase essence e Citrus terpens, foram efetivos na inibição da *S. Enteritidis* e não apresentaram ação antimicrobiana sobre o *L. plantarum*. Sabe-se que os óleos essenciais de laranja, caracterizam-se por serem ricos em limoneno, composto ao qual é atribuído a atividade antibacteriana sobre diversas espécies bacterianas patogênicas (FISHER & PHILLIPS, 2008; TAO, LIU, ZHANG, 2009). O'Bryan et al. (2008) reportaram a efetividade de três óleos comerciais de citros na inibição de onze espécies de *Salmonella spp.*, e destacou que o óleo denominado pelos autores como "Terpenes from orange essence" mostrou a maior inibição dessas bactérias (DZI > 27,0 mm), sendo que duas espécies *S. Enteritidis* 1773-32 e *S. Enteritidis* ATCC 13076, foram as mais inibidas por esse óleo (30 e 34 mm, respectivamente). Em nosso estudo, dois óleos de citros, Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpens foram ativos na inibição da espécie *S. Enteritidis* ATCC 13076 (16,2 e 17,7 mm, respectivamente). Por outro lado, o óleo de *P. pseudocaryophyllus*, exibiu uma moderada atividade antibacteriana sobre a *S. Enteritidis*. Alguns autores reportaram o eugenol como composto majoritário deste óleo essencial (SUZUKI et al., 2014), enquanto que outros autores citaram o chavibetol (MARQUES et al., 2010; BARATA et al., 2011). Dorman e Deans (2000) reportaram a efetividade do eugenol na inibição de 25 bactérias gram-positivas e gram-negativas, dentro das quais, a *Salmonella pullorum* foi moderadamente inibida ($12,9 \pm 0,1$ mm) e o *L. plantarum* extremadamente inibido ($21,5 \pm 0,6$ mm).

Eucalyptus urograndis e *Eucalyptus grandis* foram os óleos essenciais que integraram o grupo D. O óleo de *E. urograndis* tem sido citado como um óleo que contém majoritariamente o composto allo-ocimeno (LIU et al., 2008), mas Goldbeck et al. (2014) reportaram o 1,8 cineol como o composto majoritário e responsável por sua bioatividade. Contudo, existe pouca informação disponível sobre a atividade antibacteriana deste óleo. Existe também certa controvérsia sobre o composto

majoritário presente no óleo de *E. grandis*, algumas pesquisas citam como majoritário o 1,8 cineol (SU et al., 2006; ELAISSI et al., 2011), enquanto que outros estudos reportaram o α -pineno (LUCIA et al., 2007; SEWANU et al., 2015). Com respeito à atividade antibacteriana, Elaissi et al. (2011) observaram para este óleo uma moderada atividade antibacteriana sobre *S. aureus* (10,7 mm), fraca ação sobre *E. coli* (8,0 mm) e uma falta de atividade sobre a *Pseudomonas aeruginosa* (0,0 mm), tendo portanto uma fraca ação sobre bactérias patogênicas. Em nosso estudo isso foi ratificado, uma vez que se observou uma fraca ação sobre *S. Enteritidis* (10,6 mm).

O grupo E reuniu o maior número de óleos essenciais entre os grupos observados. Para os óleos deste grupo têm sido observadas composições bastante diferenciadas, assim por exemplo, o limoneno é citado como o composto majoritário em óleos essenciais de citros (FISHER; PHILLIPS, 2008); pulegona para o óleo de *M. mollis* (BANCHIO; ZYGADLO; VARRADARES, 2005) e *C. verbenacea* (HOYOS et al., 2012); 1,8 cineol (eucaliptol) para o *E. staigeriana* (GILLES et al., 2009), *E. camaldulensis* (SU et al., 2006) e *E. crebra* (AHMAD; HANIF; RASHID, 2005); geranial (SINGH et al., 2008) ou zingibereno (SACCHETTI et al., 2005) no óleo de *Z. officinale*; terpinen-4-ol para a *M. alternifolia* (HAMMER; CARSON; RILEY, 2003); γ -terpineno para o *E. urophylla* (SU et al., 2006); linalol para a *L. alba* (DUARTE et al., 2005), 1,8 cineol (FARAG et al., 2004) ou (E)-Nerolidol (PADALIA et al., 2015) para o óleo de *M. leucadendron*; (E)-Nerolidol para o óleo de *B. dracunculifolia* (PARREIRA et al., 2010) e citronelal para o óleo de *Corymbia citriodora* (BATISH et al., 2006). Contudo, uma característica comum dos óleos deste grupo foi a fraca ou nenhuma ação inibitória sobre a *S. Enteritidis* e *L. plantarum*, apesar da reconhecida atividade antibacteriana já relatada para os diferentes compostos majoritários reportados como presentes nos óleos deste grupo. Isto sugere que a ação conjunta dos compostos minoritários tenham uma participação expressiva na atividade antibacteriana dos óleos e não somente a ação individual dos compostos majoritários seja importante.

Estudo sobre os óleos selecionados

No estudo com os cinco óleos essenciais selecionados avaliados individualmente e em misturas binárias, foi observado que os dois óleos cítricos, Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpenes, reafirmaram sua atividade

antibacteriana e seletividade, mostrando um bom desempenho na inibição de bactérias patogênicas e uma fraca ação inibitória sobre bactérias probióticas.

Os óleos essenciais de citros são geralmente reconhecidos como seguros (GRAS), e têm sido reportados por ter uma atividade contra várias bactérias gram-positivas e gram-negativas, tanto em aplicação direta como na forma de vapor (FISHER; PHILLIPS, 2008).

O Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpens mostraram em nosso estudo serem efetivos e terem uma forte atividade antibacteriana sobre bactérias gram-positivas, tal como *S. aureus* e *B. subtilis*, e sobre gram-negativas, tal como *E. coli* e *S. Enteritidis*. Tao, Liu e Zhang (2009) reportaram que o óleo essencial obtido da casca da Bingtang laranja doce (*Citrus sinensis* Osbeck), rico em limoneno (77,5%), foi bastante efetivo na inibição do *S. aureus* ATCC 25923 (23,37 mm), *E. coli* ATCC 25922 (17,21 mm) e *B. subtilis* ATCC 21616 (18,89 mm). Fisher e Phillips (2006) reportaram uma forte atividade antibacteriana dos óleos cítricos de laranja (*Citrus sinensis*), tangerina (*Citrus bergamia*) e limão (*Citrus limon*), constituídos majoritariamente por limoneno (45 a 95%), sobre *E. coli* O157, *S. aureus* e *B. cereus*, mas uma atividade mais pronunciada foi observada para os compostos Citral e Linalool avaliados isoladamente. Já o Limoneno avaliado isoladamente não exerceu nenhuma ação inibitória sobre essas bactérias. Espina et al. (2011) observaram uma diferenciada atividade antibacteriana em três óleos cítricos que continham altas concentrações de limoneno (59 a 85%), sendo o óleo de mandarina (*Citrus reticulata*) o único que exerceu atividade antibacteriana sobre a maioria das bactérias avaliadas naquele estudo. Estes autores observaram que a atividade antimicrobiana de óleos cítricos não poderia ser atribuída apenas ao limoneno, mas sim à presença de outros constituintes encontrados em menores quantidades e que poderiam atuar sinergicamente.

Em nosso estudo o limoneno também foi identificado como composto majoritário nos dois óleos cítricos, mas uma grande diferença foi observada na quantidade desse composto nos óleos (20 e 87%). Devido à equivalência da atividade antibacteriana dos óleos cítricos no presente estudo e à diferente proporção do limoneno encontrada, é possível sugerir que a atividade antibacteriana de ambos os óleos foi resultado da presença dos menores composto e não do limoneno. Espina et al. (2011) indica que a presença de monoterpenos oxigenados como carvona e óxido de limoneno, identificados no óleo de mandarina, poderiam estar envolvidos na alta

atividade antibacteriana deste óleo. Em nosso estudo carvona e óxido limoneno foram identificado no Citrus Terpens e só óxido limoneno no Orange Oil Phase Essence, sendo possível que a atividade antibacteriana destes óleos cítricos estiveram relacionados com esses compostos. Carvona isoladamente, tem sido relatado na literatura como ativo na inibição de um grande grupo de bactérias patogênicas gram-positivas e gram-negativas (AGGARWAL et al. 2002), além de um grande grupo de fungos patogênicos (HARTMANS et al., 1995; AGGARWAL et al. 2002). Outros monoterpenos oxigenados como 4-terpineol, α -terpineol, cis-geraniol, β -citral, nerol e α -citral foram citados como possíveis responsáveis da eficácia antibacteriana de dois variedades de óleos de limão (*Citrus limon* L. Burm.) (SETANNI et al., 2012).

Contudo, uma menor atividade antibacteriana foi observada para a *L. innocua* por estes dois óleos, sendo ambos considerados moderadamente ativos sobre esta bactéria. Evrendilek (2015) reportaram uma fraca atividade antibacteriana do óleo da casca de *Citrus sinensis* contendo 90,1% de limoneno sobre esta bactéria (8,2 mm), ratificando o encontrado em nosso resultado. Friedly et al. (2009) também avaliaram o efeito sobre espécies de *Listeria* de cinco óleos comerciais de citros e observaram que o óleo sem a presença de terpenos exerceu um forte efeito antibacteriano sobre *L. monocytogenes* e *L. innocua*, enquanto os três óleos ricos em terpenos e o d-limoneno apresentaram uma fraca ação sobre as espécies de *Listeria*, sendo os resultados coerentes com os efeitos observados com o Citrus Terpens (rico em terpenos) e o Orange Oil Phase Essence (majoritariamente constituído por limoneno) sobre a *L. innocua* em nosso estudo.

Referente ao *E. faecalis*, foi a única bactéria sobre a qual os óleos essenciais cítricos não foram efetivos na sua inibição. Similar resultado foi reportado por Espina et al. (2011), onde o *E. faecium* não foi inibido pelos óleos cítricos comerciais de laranja (*Citrus sinensis*) e limão (*Citrus lemon*).

No caso das bactérias probióticas, *L. pantarum* e *L. rhamnosus*, uma atividade antibacteriana muito fraca foi observada para Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpens, mostrando que estes óleos de citros foram menos efetivos na inibição destas bactérias probióticas. Isto também foi observado por Viuda-Martos, M. et al. (2008) que reportaram a avaliação da atividade antibacteriana de quatro óleos essenciais obtidos a partir da casca de frutos cítricos, sendo os óleo de laranja (*Citrus sinensis* L.) e tangerina (*C. reticulada* L.) os que exerceram a mais baixa atividade sobre *L. sakei* e *L. curvatus*.

Muitos estudos têm mostrado que a combinação de diversos óleos essenciais poderia estimular e potencializar a atividade antibacteriana observada individualmente. Este efeito sinérgico pode ser produzido pela interação entre os componentes dos óleos essenciais levando-os a uma maior atividade antibacteriana. A interação pode-se dar por inibição sequencial de uma via bioquímica comum dos micro-organismos, à inibição de enzimas de proteção e a modificação do funcionamento da parede celular. Porém, a interação dos componentes dos óleos essenciais também pode levar a um efeito aditivo ou antagonista da atividade antibacteriana de misturas de óleos essenciais (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

Para avaliar a interação dos componentes das misturas avaliadas em nosso estudo, propusemos uma modificação do cálculo do Índice da Concentração Inibitória Fraccionada (CIF), que é amplamente utilizado para avaliar a interação da combinação de dois antimicrobianos como os óleos essenciais. Em misturas 1:1 ou em misturas de óleos essenciais, o CIF é um parâmetro bastante aceito que permite medir e interpretar a interação dos óleos essenciais sobre sua atividade antimicrobiana (VAN VUUREN; VILJOEN, 2007) e é calculado tradicionalmente por divisão do valor da Concentração Inibitória Mínima da mistura pelo valor da Concentração Inibitória Mínima de cada óleo da mistura avaliado individualmente (DE RAPPER et al., 2012). Assim, nós propusemos o cálculo do Índice do Efeito Inibitório (IEI) de misturas binárias de óleos essenciais na proporção 1:1, a uma mesma concentração da mistura, na base da divisão dos diâmetros de inibição dos óleos individuais em relação aos diâmetros de inibição produzidos pelas misturas, para avaliar dessa forma o efeito da interação dos óleos essenciais através de uma triagem pelo método de difusão em disco.

Os resultados observados com as 10 misturas binárias 1:1, mostraram efeitos diversos dependendo dos óleos e bactérias avaliadas, mas destaca-se que uma maior incidência de efeitos sinérgicos foi observada sobre as bactérias patogênicas. Em outros estudos também foram observados efeitos diversos da interação de óleos essenciais em misturas binárias 1:1 sobre bactérias patogênicas (GOÑI et al., 2009; DE RAPPER et al., 2012, 2013; AHMAD, VAN VUUREN, VIJOEN, 2014). Contudo, existem estudos que mostram que a interação de dos óleos essenciais em misturas binárias com diferentes proporções de cada óleo essencial, produziram somente efeitos positivos, sinergismo e aditividade, e não efeitos antagônicos (OROOJALIAN et al., 2010; SADIKI et al., 2014).

Da mesma forma, quando os óleos essenciais atuam em combinação com antibióticos a diferentes proporções, a eficácia da atividade antibacteriana de ambos pode ser potencializada, observando-se efeitos positivos produto de sua interação (ROSATO et al. 2007), ou efeitos antagônicos, destacando que a eficácia da interação de dos componentes é dependente da proporção em que os componentes de uma mistura coexistem (VAN VUUREN et al., 2009).

2.5 Conclusões

O estudo permitiu observar, através de uma triagem de vinte oito diferentes óleos essenciais, o potencial antibacteriano seletivo dos óleos de *E. globulus*, *E. exserta*, *P. pseudocaryophyllus*, Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpens sobre bactérias patogênicas e probióticas, com uma diminuída atividade antibacteriana sobre as bactérias benéficas. Um novo parâmetro foi proposto para avaliar a interação desses cinco óleos essenciais em misturas binárias 1:1, ao qual, denominamos índice do Efeito Inibitório e que propusemos como uma medida da eficácia antibacteriana das misturas. Assim, as misturas mostram ter maioritariamente efeitos antagônicos na inibição das bactérias probióticas, sendo isto favorável. Porém, os óleos Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpens, subprodutos do processamento de laranja para obtenção de suco, destacaram-se por apresentar, individualmente, o melhor desempenho antibacteriano seletivo com uma baixa atividade antibacteriana sobre as bactérias probióticas, sendo possível sugerir o aproveitamento destes subprodutos como alternativas aos antibióticos convencionais.

Referencias

AARESTRUP, F.M. Effects of termination of AGP use on antimicrobial resistance in food animals. In: **Working papers for the WHO international review panels evaluation-World Health Organization**, Geneva-Switzerland., 2003. p. 6–11.

AGGARWAL, K.K.; KHANUJA, S.P.S.; AHMAD, A.; SANTHA KUMAR, T.R.; GUPTA, V.K.; KUMAR, S. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 17, n. 1, p. 59-63, 2002.

AHMAD, N.R.; HANIF, M.A.; RASHID, U. Chemical compositional and intra provenance variation for content of essential oil in *Eucalyptus crebra*. **Asian Journal Plant Science**, Pakistan, n. 4, n. 5, p. 519-523, 2005.

AHMAD, A.; VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils—the case of *Thymus vulgaris* (Thyme). **Molecules**, Basel, v. 19, n. 3, p. 2896-2910, 2014.

AL-BAYATI, F.A. Synergistic antibacterial activity between *Thymus vulgaris* and *Pimpinella anisum* essential oils and methanol extracts. **Journal of ethnopharmacology**, Lausanne, v. 116, n. 3, p. 403-406, 2008.

AUTIO, T.; SÄTERI, T.; FREDRIKSSON-AHOMAA, M.; RAHKIO, M.; LUNDÉN, J.; KORKEALA, H. *Listeria monocytogenes* contamination pattern in pig slaughterhouses. **Journal of Food Protection**, Des Moines-Iowa, v. 63, n. 10, p. 1438-1442, 2010.

BANCHIO, E.; ZYGADLO, J.; VALLADARES, G.R. Effects of mechanical wounding on essential oil composition and emission of volatiles from *Minthostachys mollis*. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 31, n. 4, p.719-727, 2005.

BARATA, L.E.; dos SANTOS, B.C.; MARQUES, F.A.; BARONI, A.C.; de OLIVEIRA, P.R.; EINLOFT, P.; GUERRERO JR, P.G. Seasonal Variation of the Volatile Constituents from Leaves of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes). **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream-Illinois, v. 23, n. 4, p. 54-57, 2011.

BASSOLÉ, I.H.N.; JULIANI, H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.

BATISH, D.R.; SINGH, H.P.; SETIA, N.; KAUR, S.; KOHLI, R.K. Chemical composition and inhibitory activity of essential oil from decaying leaves of *Eucalyptus citriodora*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Tübingen, v. 61, n. 1/2, p. 52-56, 2006.

BURCH, D.G.S; DURAN, C.O.; AARESTRUP, F.M. Guidelines for antimicrobial use in swine. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. (Ed.). **Guide to Antimicrobial Use in Animals**. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing, 2008. chap. 7, p. 102-125.

CHOCT, M. Managing gut health through nutrition. **British Poultry Science**, London, v. 50, n. 1, p. 9-15, 2009.

CIMANGA, K.; KAMBU, K.; TONA, L.; APERS, S.; DE BRUYNE, T.; HERMANS, N.; TOTTE, J.; PIETERS, L.; VLIETINCK, A. J. Correlation between chemical composition and antibacterial activity of essential oils of some aromatic medicinal plants growing in the Democratic Republic of Congo. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 79, n. 2, p. 213-220, 2002.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2012.

CUI, S.; LI, J.; HU, C.; JIN, S.; LI, F.; GUO, Y.; RAN, L.; MA, Y. Isolation and characterization of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* from swine and workers in China. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 64, n. 4, p. 680-683, 2009.

DE NEELING, A.J.; VAN DEN BROEK, M.J.M.; SPALBURG, E.C.; VAN SANTEN-VERHEUVEL, M.G.; DAM-DEISZ, W.D.C.; BOSHUIZEN, H.C.; VAN DE GIESSEN, A.W.; VAN DUIJKEREN, E.; HUIJSDENS, X.W. High prevalence of methicillin resistant *Staphylococcus aureus* in pigs. **Veterinary microbiology**, Amsterdam, v. 122, n. 3, p. 366-372, 2007.

DE RAPPER, S.; KAMATOU, G.; VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S. The *in vitro* antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2013, p. 852049, 2013.

DE RAPPER, S.; VAN VUUREN, S. F.; KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M.; DAGNE, E. The additive and synergistic antimicrobial effects of select frankincense and myrrh oils—a combination from the pharaonic pharmacopoeia. **Letters in applied microbiology**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 352-358, 2012.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, Champaign-Illinois, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005.

DJABOU, N.; LORENZI, V.; GUINOISEAU, E.; ANDREANI, S.; GIULIANI, M. C.; DESJOBERT, J. M.; BOLLA, J.M.; COSTA, J.; BERTI, L.; LUCIANI, A.; MUSELLI, A. Phytochemical composition of *Corsican Teucrium* essential oils and antibacterial activity against foodborne or toxi-infectious pathogens. **Food Control**, Guildford, v. 30, n. 1, p. 354-363, 2013.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

DOS SANTOS, C.P.; DE OLIVEIRA, T.C.; PINTO, J.A.O.; FONTES, S.S.; CRUZ, E.M.O.; DE FÁTIMA ARRIGONI-BLANK, M.; ANDRADE, T.M.; DE MATOS, L.L.; ALVES, P.B.; INNECO, R.; BLANK, A.F. Chemical diversity and influence of plant age on the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. germplasm. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 76, p. 416-421, 2015.

DUARTE, M.C.T.; FIGUEIRA, G.M.; SARTORATTO, A.; REHDER, V.L.G.; DELARMELINA, C. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

ELAISSI, A.; SALAH, K. H.; MABROUK, S.; LARBI, K. M.; CHEMLI, R.; HARZALLAH-SKHIRI, F. Antibacterial activity and chemical composition of 20

Eucalyptus species' essential oils. **Food Chemistry**, London, v. 129, n. 4, p. 1427-1434, 2011.

ERTAS, O.N.; TALAT, G.; MEHMET, C.; BESTAMI, D.; SIMSEK, U.G. The effect of an essential oil mix derived from oregano, clove and anise on broiler performance. **International Journal of Poultry Science**, Faisalabad, v. 4, n. 11, p. 879-884, 2005.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food control**, Guildford, v. 22, n. 6, p.896-902, 2011.

EVRENDILEK, G.A. Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 202, p. 35-41, 2015.

FAIRBROTHER, J.M.; NADEAU, É.; GYLES, C.L. *Escherichia coli* in postweaning diarrhea in pigs: an update on bacterial types, pathogenesis, and prevention strategies. **Animal Health Research Reviews**, London, v. 6, n. 01, p. 17-39, 2005.

FARAG, R.S.; SHALABY, A.S.; EL-BAROTY, G.A.; IBRAHIM, N.A.; ALI, M.A.; HASSAN, E.M. Chemical and biological evaluation of the essential oils of different *Melaleuca* species. **Phytotherapy Research**, London, v. 18, n. 1, p. 30-35, 2004.
FISHER, K.; PHILLIPS, C.A. The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 101, n. 6, p. 1232-1240, 2006.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer?. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 19, n. 3, p. 156-164, 2008.

FRANZ, C.; BASER, K.H.C.; WINDISCH, W. Essential oils and aromatic plants in animal feeding—a European perspective. **A review. Flavor and Fragrance journal**, Chichester, v. 25, n. 5, p. 327-340, 2010

FRIEDLY, E.C.; CRANDALL, P.G.; RICKE, S.C.; ROMAN, M.; O'BRYAN, C.; CHALOVA, V. I. *In vitro* antilisterial effects of citrus oil fractions in combination with organic acids. **Journal of Food Science**, Chicago-Illinois, n. 74, n. 2, p. M67-M72, 2009.

GAGGIÀ, F.; MATTARELLI, P.; BIAVATI, B. Probiotics and prebiotics in animal feeding for safe food production. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 141, p. S15-S28, 2010.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian *Eucalyptus* species. **Food Chemistry**, London, v. 119, n. 2, p. 731-737, 2010.

- GOLDBECK, J.C.; DO NASCIMENTO, J.E.; JACOB, R.G.; FIORENTINI, Â.M.; DA SILVA, W.P. Bioactivity of essential oils from *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus urograndis* against planktonic cells and biofilms of *Streptococcus mutans*. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 60, p. 304-309, 2014.
- GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, London, v. 116, n. 4, p. 982-989, 2009.
- HAMMER, K.; CARSON, C.F.; RILEY, T.V. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 95, n. 4, p. 853-860, 2003.
- HARTMANS, K.J.; DIEPENHORST, P.; BAKKER, W.; GORRIS, L.G. The use of carvone in agriculture: sprout suppression of potatoes and antifungal activity against potato tuber and other plant diseases. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 4, n. 1, p. 3-13, 1995.
- HELANDER, I.M.; ALAKOMI, H.L.; LATVA-KALA, K.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POL, I.; SMID, E.J.; GORRIS, L.G.M.; VON WRIGHT, A. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, Easton-Pennsylvania, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.
- HOYOS, J.M.Á.; ALVES, E.; ROZWALKA, L.C.; SOUZA, E.A.; ZEVIANI, W.M. Antifungal activity and ultrastructural alterations in *Pseudocercospora griseola* treated with essential oils. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras-Minas Gerais v. 36, n. 3, p. 270-284, 2012.
- HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R.L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 3, p. 12, 2012.
- IKE, Y.; TANIMOTO, K.; OZAWA, Y.; NOMURA, T.; FUJIMOTO, S. & TOMITA, H. Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. **The Lancet**, London, v. 353, n. 9167, p. 1854, 1999.
- JANG, I.S.; KO, Y.H.; KANG, S.Y.; LEE, C.Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 134, n. 3, p. 304-315, 2007.
- JOHNY, A.K.; DARRE, M.J.; DONOGHUE, A.M.; DONOGHUE, D.J.; VENKITANARAYANAN, K. Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol, and thymol on *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents *in vitro*. **The Journal of Applied Poultry Research**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 237-244, 2010.
- KHATTAK, F.; RONCHI, A.; CASTELLI, P. SPARKS, N. Effects of natural blend of essential oil on growth performance, blood biochemistry, cecal morphology, and

carcass quality of broiler chickens. **Poultry science**, Champaign-Illinois, v. 93, n. 1, p 132-137, 2014.

KIRKPINAR, F.; ÜNLÜ, H.B.; ÖZDEMİR, G. Effects of oregano and garlic essential oils on performance, carcass, organ and blood characteristics and intestinal microflora of broilers. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 137, n. 1, p. 219-225, 2011.

KÖCK, R.; HARLIZIUS, J.; BRESSAN, N.; LAERBERG, R.; WIELER, L. H.; WITTE, W.; DEURENBERG, R. H.; VOSS, A.; BECKER, K.; FRIEDRICH, A. W. Prevalence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) among pigs on German farms and import of livestock-related MRSA into hospitals. **European Journal Of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, Wiesbaden, v. 28, n. 11, p. 1375-1382, 2009.

LA RAGIONE, R. M.; WOODWARD, M. J. Competitive exclusion by *Bacillus subtilis* spores of *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and *Clostridium perfringens* in young chickens. **Veterinary Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n 3, p. 245-256, 2003.

LI, S.Y.; RU, Y.J.; LIU, M.; XU, B.; PÉRON, A.; SHI, X.G. The effect of essential oils on performance, immunity and gut microbial population in weaner pigs. **Livestock Science**, Amsterdam, v. 145, n. 1, p. 119-123, 2012.

LIU, X.; CHEN, Q.; WANG, Z.; XIE, L.; XU, Z. Allelopathic effects of essential oil from *Eucalyptus grandis* × *E. urophylla* on pathogenic fungi and pest insects. **Frontiers of Forestry in China**, China, v. 3, n. 2, p. 232-236, 2008.

LÖHREN, U.; RICCI, A.; CUMMINGS, T.S. Guidelines for antimicrobial use in poultry. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. (Ed.). **Guide to Antimicrobial Use in Animals**. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing, Ltd., 2008. chap. 8, p. 126-142.

LUCIA, A.; AUDINO, P.G.; SECCACINI, E.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; MASUH, H. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *Aedes aegypti* larvae. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno-California, v. 23, n. 3, p. 299-303, 2007.

MANCINI, E.; SENATORE, F.; DEL MONTE, D.; DE MARTINO, L.; GRULOVA, D.; SCOGNAMIGLIO, M.; SNOUSSI, M.; DE FEO, V. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 7, p. 12016-12028, 2015.

MARQUES, F.A.; WENDLER, E.P.; BARONI, A.C.; DE OLIVEIRA, P.R.; SASAKI, B.S.; GUERRERO JR, P.G. Leaf Essential Oil Composition of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) LR Landrum Native From Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream-Illinois, v. 22, n. 2, p. 150-152, 2010.

MATHLOUTHI, N.; BOUZAIENNE, T.; OUESLATI, I.; RECOQUILLAY, F.; HAMDİ, M.; URDACI, M.; BERGAOUI, R. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: *in vitro* antimicrobial activities and effects on

growth performance. **Journal of animal science**, Champaign-Illinois, v. 90, n. 3, p. 813-823, 2012.

MOLNÁR, A.K.; PODMANICZKY, B.; KÜRTI, P.; TENK, I.; GLÁVITS, R.; VIRÁG, G. Y.; SZABÓ, Z.S. Effect of different concentrations of *Bacillus subtilis* on growth performance, carcass quality, gut microflora and immune response of broiler chickens. **British Poultry Science**, London, v. 52, n. 6, p. 658-665, 2011.

MORENO, L.Z.; PAIXAO, R.; GOBBI, D.D.; RAIMUNDO, D.C.; FERREIRA, T.P.; HOFER, E.; MATTER, M.H.; MORENO, A.M. Characterization of atypical *Listeria innocua* isolated from swine slaughterhouses and meat markets. **Research in Microbiology**, Paris, v. 163, n. 4, p. 268-271, 2012.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; REICHLING, J.; WINK, M. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 49, n. 9, p. 893-899, 2011.

NIKOLIĆ, M.; GLAMOČLIJA, J.; FERREIRA, I.C.; CALHELHA, R.C.; FERNANDES, Â.; MARKOVIĆ, T.; GIWELI, A.; SOKOVIĆ, M. Chemical composition, antimicrobial, antioxidant and antitumor activity of *Thymus serpyllum* L., *Thymus algeriensis* Boiss. and Reut and *Thymus vulgaris* L. essential oils. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 52, p. 183-190, 2014.

O'BRYAN, C.A.; CRANDALL, P.G.; CHALOVA, V.I.; RICKE, S.C. Orange essential oils antimicrobial activities against *Salmonella* spp. **Journal of Food Science**, Chicago-Illinois, v. 73, n. 6, p. M264-M267, 2008.

OLIVEIRA, F.P.D.; LIMA, E.D.O.; SIQUEIRA JÚNIOR, J.P.D.; SOUZA, E. L D.; SANTOS, B.H.C.; BARRETO, H.M. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham.(Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 4, p. 510-516, 2006.

OROOJALIAN, F.; KASRA-KERMANSHAH, R.; AZIZI, M.; BASSAMI, M. R. Phytochemical composition of the essential oils from three *Apiaceae* species and their antibacterial effects on food-borne pathogens. **Food chemistry**, London, v. 120, n. 3, p. 765-770, 2010.

OUWEHAND, A.C.; TIIHONEN, K.; KETTUNEN, H.; PEURANEN, S.; SCHULZE, H.; RAUTONEN, N. *In vitro* effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. **Veterinarni Medicina**, Praha, v.55, n. 2, p. 71-78, 2010.

PADALIA, R.C.; VERMA, R. S.; CHAUHAN, A.; CHANOTIYA, C.S. The essential oil composition of *Melaleuca leucadendra* L. grown in India: A novel source of (E)-nerolidol. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 69, p. 224-227, 2015.

PARREIRA, N.A.; MAGALHÃES, L.G.; MORAIS, D.R.; CAIXETA, S.C.; DE SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; CUNHA, W.R.; SILVA, M.L.; NANAYAKKARA, N.P.D.;

RODRIGUES, V.; DA SILVA FILHO, A.A. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, Zürich, v. 7, n. 4, p.993-1001, 2010.

PATTERSON, J.A.; BURKHOLDER, K.M. Application of prebiotics and probiotics in poultry production. **Poultry Science**, Champaign-Illinois, v. 82, n. 4, p. 627-631, 2003.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC complementary and alternative medicine**, London, v. 6, n. 1, p. 39, 2006.

ROSATO, A.; VITALI, C.; DE LAURENTIS, N.; ARMENISE, D.; MILILLO, M.A. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. **Phytomedicine**, Jena, v. 14, n. 11, p. 727-732, 2007.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.

SADIKI, M.; BALOUIRI, M.; BARKAI, H.; MAATAOUI, H.; KORAICHI, S. I.; ELABED, S. Synergistic antibacterial effect of *Myrtus communis* and *Thymus vulgaris* essential oils fractional inhibitory concentration index. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Madhya Pradesh, v. 6, p.121-124, 2014.

SETTANNI, L.; PALAZZOLO, E.; GUARRASI, V.; ALEO, A.; MAMMINA, C.; MOSCHETTI, G.; GERMANÀ, M. A. Inhibition of foodborne pathogen bacteria by essential oils extracted from citrus fruits cultivated in Sicily. **Food Control**, Guildford, v. 26, n. 2, p. 326-330, 2012.

SEWANU, S.O.; BONGEKILE, M.C.; FOLUSHO, O.O.; ADEJUMOBI, L.O.; ROWLAND, O.A. Antimicrobial and efflux pumps inhibitory activities of *Eucalyptus grandis* essential oil against respiratory tract infectious bacteria. **Journal of Medicinal Plants Research**, Nigeria, v. 9, n. 10, p. 343-348, 2015.

Si, W.; GONG, J.; TSAO, R.; ZHOU, T.; YU, H.; POPPE, C.; JOHNSON, R.; DU, Z. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 2, p. 296-305, 2006.

SINGH, G.; KAPOOR, I.P.S.; SINGH, P.; DE HELUANI, C.S.; DE LAMPASONA, M.P.; CATALAN, C. A. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 10, p. 3295-3302, 2008.

SU, Y.C.; HO, C.L.; WANG, I.C.; CHANG, T. Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four eucalypts, **Taiwan Journal of Forest Science**, Taiwan, v. 21, n. 1, p. 49-61, 2006.

SUGIHARTO, S. Role of nutraceuticals in gut health and growth performance of poultry. **Journal of the Saudi Society of Agricultural Sciences**, Saudi Arabia, Article in Press, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jssas.2014.06.001>> Acesso em: 14 Mar. 2015.

SUZUKI, É.Y.; BAPTISTA, E.B.; RESENDE DO CARMO, A.M.; CHAVES, M.; AFONSO, M.D.G.; CHICOUREL, E.L.; BARBOSA RAPOSO, N.R. Potential of the essential oil from *Pimenta pseudocaryophyllus* as an antimicrobial agent. **Acta Pharmaceutica**, Zagreb, v. 64, n. 3, p. 379-385, 2014.

TAO, N.G.; LIU, Y.J.; ZHANG, M.L. Chemical composition and antimicrobial activities of essential oil from the peel of bingtang sweet orange (*Citrus sinensis* Osbeck). **International Journal Of Food Science & Technology**, Oxford, v. 44, n. 7, p. 1281-1285, 2009.

VAN DEN BOGAARD, A.E.J.M.; LONDON, N.; STOBBERINGH, E.E. Antimicrobial resistance in pig faecal samples from The Netherlands (five abattoirs) and Sweden. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 45, n. 5, p. 663-671, 2000.

VAN VUUREN, S.F.; SULIMAN, S.; VILJOEN, A.M. The antimicrobial activity of four commercial essential oils in combination with conventional antimicrobials. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 440-446, 2009.

VAN VUUREN, S.F.; VILJOEN, A.M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1, 8-cineole alone and in combination. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 22, n. 6, p. 540-544, 2007.

VIUDA-MARTOS, M.; RUIZ-NAVAJAS, Y.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; PEREZ-ÁLVAREZ, J. Antibacterial activity of lemon (*Citrus lemon* L.), mandarin (*Citrus reticulata* L.), grapefruit (*Citrus paradisi* L.) and orange (*Citrus sinensis* L.) essential oils. **Journal of Food Safety**, Westport-Connecticut, v. 28, n. 4, p. 567-576, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Global principles for the containment of antimicrobial resistance in animals intended for food: Report of a WHO consultation with the participation of the Food and Agriculture Organization of the United Nations and the Office International des Epizooties, Geneva-Switzerland, 5-9 June 2000. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/68931/1/WHO_CDS_CSR_APH_2000.4.pdf>. Acesso em: Jan, 2015.

3. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA *IN VITRO* DE UM ÓLEO ESSENCIAL CÍTRICO E DE UMA MISTURA BINÁRIA DE ÓLEOS ESSENCIAIS SOBRE *Enterococcus faecalis* E *Lactobacillus rhamnosus*

Resumo

Várias consequências têm surgido a partir do uso frequente dos antibióticos na alimentação animal, como o aparecimento de *Enterococcus* sp. resistentes a múltiplas drogas. Devido a isto, muitas alternativas têm sido estudadas para substituir aos antibióticos na dieta animal. Uma vez que, estudos têm mostrado que os óleos essenciais apresentam boas propriedades antimicrobianas, eles podem ser uma alternativa excelente para substituir aos antibióticos. Similarmente, os probióticos, como espécies de *Lactobacillus*, têm sido utilizados na alimentação animal para controlar às bactérias patogênicas e promover o crescimento animal. Portanto, é importante que uma alternativa aos antibióticos não afete às bactérias probióticas. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de um óleo essencial cítrico (Orange Oil Phase Essence) e da mistura de óleos essenciais (MOE) de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* sobre a bactéria patogênica *E. faecalis* e a probiótica *L. rhamnosus*, mediante a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). Ambos, Orange Oil Phase Essence e a MOE foram avaliados pelo método de microdiluição usando concentrações duplas seriadas na faixa de 14,80 a 0,116 mg/mL. As CIMs foram determinadas utilizando dois métodos: construção de curvas de sobrevivência (600 nm) e o teste de resazurina. As CBMs foram determinada por plaqueamento. Os resultados mostraram que a MOE e o óleo cítrico apresentaram atividade antibacteriana. As CIM determinadas para MOE sobre *E. faecalis* e *L. rhamnosus* foram 14,80 mg/mL e 7,40 mg/mL, respectivamente, por ambos métodos usados. Mas, a determinação da CIM para Orange Oil Phase Essence sobre *E. faecalis* mostrou resultados discordantes pelos dois métodos. Mediante as curvas de sobrevivência a CIM foi de 14,80 mg/mL, enquanto que, pelo teste de resazurina não foi possível sua determinação na faixa de concentrações avaliadas. A CIM para este óleo cítrico sobre *L. rhamnosus* foi 14,80 mg/mL, por ambos os métodos. A determinação da CBM foi possível só para MOE sobre a bactéria probiótica (14,80 mg/mL). As curvas de sobrevivência mostraram que Orange Oil Phase Essence à concentração de 3,70 mg/mL, apresentou uma ação antibacteriana seletiva, com uma menor inibição da bactéria probiótica. As curvas de sobrevivência também permitiram observar que o emulsionante Tween 80 (usado para dispersar o óleo cítrico e a MOE no meio de cultura líquido) produziu um declive da população de *E. faecalis* na fase estacionária. No entanto, este efeito não mostrou afetar a atividade antibacteriana do óleo cítrico e da MOE uma vez que, sua ação foram no tempo de início e na população bacteriana final da fase exponencial do *E. faecalis*.

Palavras - chaves: Atividade antibacteriana; Óleo essencial de citrus; *Eucalyptus globulus*; *Pimenta pseudocaryophyllus*; Curvas de sobrevivência bacteriana.

Abstract

Several consequences have arisen from the frequent use of antibiotics in the animal feed, like the emergence of multidrug-resistant Enterococci bacteria. Due to this, many alternatives have been studied to substitute the antibiotics in animal diet. Once, studies have showed that essential oils present good antimicrobial properties they may be an excellent alternative to replace antibiotics. Similarly, probiotics like *Lactobacillus* species have been used in animal nutrition to control pathogenic bacteria and to promote animal growth. Therefore, it is important that an alternative to antibiotics does not affect the probiotic bacteria. The aim of this study was to evaluate the antibacterial activity of a citrus essential oil (Orange Essence Oil Phase) and the blend of essential oil (BEO) of *E. globulus* and *P. pseudocaryophyllus* against the pathogenic bacterium *E. faecalis* and the probiotic bacterium *L. rhamnosus*, by determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum Bactericidal Concentration (MBC). Both, Orange Oil Phase Essence and the BEO were evaluated by microdilution method using two-fold serial concentrations from 14.80 to 0.116 mg/ml. The MICs were determined using two methods: Construction of survival curves (600 nm) and resazurin test. The MBCs were determined by plating. The results showed that the BEO and citrus oil presented antibacterial activity. MICs determination for BEO on *E. faecalis* and *L. rhamnosus* were 14.80 mg/mL and 7.40 mg/mL, respectively, for both used methods. But, MIC determination for Orange Oil Phase Essence on *E. faecalis* showed discordant results by two methods. By survival curves the MIC was 14.80 mg/mL, whereas by resazurin it was not possible its determination within of evaluated concentration range. The MIC for this citrus oil on *L. rhamnosus* was 14.80 mg/mL by both methods. The MBC determination was possible just for BEO on probiotic bacterium (14.80 mg/mL). The survival curves showed that Orange Oil Phase Essence at the concentration of 3.70 mg/mL presented a selective antibacterial action, with less inhibition of probiotic bacteria. The survival curves also allowed to observe that the emulsifier Tween 80 (used to disperse the citrus oil and the BEO in the liquid culture medium) produced a decline of *E. faecalis* population at the stationary phase. However, this effect did not show to affect the antibacterial activity of the citrus oil and the BEO once their action were on the start time and final bacterial population of exponential phase of *E. faecalis*.

Keywords: Antibacterial activity; Citrus essential oil; *Eucalyptus globulus*; *Pimenta pseudocaryophyllus*; bacterial survival curves.

Resumen

Varias consecuencias han surgido del uso frecuente de los antibióticos en la alimentación animal, como la aparición de *Enterococcus* sp. resistentes a múltiples fármacos. Debido a esto, muchas alternativas han sido estudiadas para sustituir a los antibióticos en la alimentación animal. Una vez que, varios estudios han mostrado que los aceites esenciales tienen buenas propiedades antimicrobianas, ellos pueden ser una excelente alternativa para sustituir a los antibióticos. Similarmente, los probióticos, como especies de *Lactobacillus*, se han utilizado en la alimentación animal para controlar a las bacterias patógenas y promover el crecimiento animal. Por lo tanto, es importante que una posible alternativa a los antibióticos no afecte a las bacterias probióticas. El objetivo de este estudio fue evaluar la actividad antibacteriana de un aceite esencial cítrico (Orange Oil Phase Essence) y de la mezcla de los aceites esenciales (MAE) de *E. globulus* y *P. pseudocaryophyllus* sobre la bacteria patógena *E. faecalis* y la probiótica *L. rhamnosus*, mediante la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM). Tanto Orange Oil Phase Essence y la MAE fueron evaluados por el método de microdilución usando concentraciones dobles seriadas desde 14,80 a 0,116 mg/mL. Las CIMs se determinaron utilizando dos métodos: Construcción de curvas de sobrevivencia (600 nm) y el test de resazurina. Las CBMs fueron determinadas por plaqueamiento. Los resultados mostraron que a MAE y el aceite cítrico presentaron actividad antibacteriana. Las CIM determinadas para a MAE sobre *E. faecalis* e *L. rhamnosus* fueron 14,80 y 7,40 mg/mL, respectivamente, por ambos métodos utilizados. Sin embargo, la determinación de la CIM para Orange Oil Phase Essence sobre *E. faecalis* mostró resultados discordantes por los dos métodos. Mediante las curvas de sobrevivencia la CIM fue de 14,80 mg/mL, mientras que por el test de resazurina no fue posible su determinación en el rango de concentraciones evaluadas. La CIM para este aceite cítrico sobre *L. rhamnosus* fue de 14, 80 mg/mL, por ambos métodos. La determinación de la CBM fue posible sólo para MAE sobre la bacteria probiótica (14,80 mg/mL). Las curvas de sobrevivencia mostraron que Orange Oil Phase Essence a la concentración de 3,70 mg/mL, este aceite tuvo una actividad antibacteriana selectiva, con menor inhibición de la bacteria probiótica. Las curvas de sobrevivencia también permitieron observar que el emulsionante Tween 80 (utilizado para dispersar el aceite cítrico y la mezcla dentro del medio de cultivo líquido) produjo un declive de la población de *E. faecalis* en la fase estacionaria. No obstante, este efecto no mostró afectar la actividad antibacteriana del aceite cítrico y de la MAE ya que ellos actuaron no tempo de inicio y en la población bacteriana final de la fase exponencial del crecimiento de *E. faecalis*.

Palabras-claves: Actividad antibacteriana, Aceite esencial cítrico; *Eucalyptus globulus*; *Pimenta pseudocaryophyllus*; Curvas de sobrevivencia bacteriana.

3.1 Introdução

O Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC) dos Estados Unidos estima que cada ano mais de 2 milhões de pessoas ficam doentes, naquele país, por uma infecção produzida por alguma bactéria resistente a antibióticos, e pelo menos 23 mil pessoas morrem produto dessa infecção (CDC, 2015). O uso de antibióticos na produção animal para a prevenção de doenças (manutenção da saúde) e promoção do crescimento animal (produtividade) é uma das principais causas do surgimento de resistência bacteriana aos antibióticos e da transmissão dessa resistência aos humanos através da cadeia alimentar pelo consumo de alimentos de origem animal (McEWEN; FEDORKA-CRAY, 2002). O uso global de antibióticos na produção animal no 2010 foi estimado em 63.151 toneladas de antibióticos, sendo que o consumo médio anual de antibióticos por quilograma de animal produzido foi maior para frangos e suínos, 148 mg/kg e 172 mg/kg, respectivamente (VAN BOECKEL et al., 2015). Além disso, os mesmos autores estimaram que os cinco países com maior consumo de antibióticos na produção animal foram China, Estados Unidos, Brasil, Índia e Alemanha.

Uma preocupação maior existe pela resistência adquirida aos antibióticos em agentes patogênicos gram-negativos, para os quais tem ocorridos relatos de resistência à maioria dos antibióticos tais como *Salmonella enterica* sorovar Thyphimurium U288 em suínos (HOOTON et al., 2014) e *S. Thyphimurium* DT 104 em frangos (RAJASHEKARA et al., 2000). Contudo, essa preocupação também se estende para algumas bactérias gram-positivas, como *Enterococcus* sp. que tem sido reportada como resistente a diversos antibióticos (MAASJOST et al., 2015), inclusive ao antibiótico Vancomicina (VRE) depois que esse antibiótico começou a ser usado como melhoradores do desempenho em animais pelos anos 1980s (KHACHATOURIANS, 1998). Anualmente, estima-se que 66.000 mil casos de infecção com *Enterococcus* sp. ocorre nos Estados Unidos a cada ano, dos quais 20.000 casos são produzidos por espécies resistentes à Vancomicina e 1.300 terminam em morte (CDC, 2013). O *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* são habitantes normais do trato gastrointestinal dos animais e a presença de isolados dessas espécies resistentes à Vancomicina foi reportado em fezes de suínos e aves (AARESTRUP et al., 1996; IKE et al., 1999). A CDC estima que *E. faecalis* resistente à Vancomicina é responsável por 9% dos casos de infecção nos Estados Unidos cada ano.

Tentando diminuir o problema da resistência bacteriana, diversas pesquisas têm sido realizadas tentando encontrar-se alternativas para substituir os antibióticos melhoradores do desempenho em suínos e aves (YANG; IJI; CHOCT, 2009).

Os óleos essenciais por apresentarem frequentemente uma ação antimicrobiana, aparecem como uma alternativa natural para substituição dos antibióticos atualmente utilizados (DIAZ-SANCHEZ et al., 2015; FRIEDMAN, 2015). Contudo, outra alternativa atualmente bastante utilizada com o objetivo de promover o melhor desempenho animal são os probióticos, leveduras ou bactérias, tais como espécies de *Lactobacillus*, entre elas *L. rhamnosus*, que são amplamente utilizadas na União Europeia como aditivos probióticos na alimentação animal (ANADÓN; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA; MARTÍNEZ, 2006).

Estudos anteriores empregando óleos essenciais para a inibição de *E. faecalis* mostraram uma fraca inibição (ELAISSI et al., 2011) ou nenhuma inibição (MATHLOUTHI et al., 2012) desta bactéria, sendo ela resistente aos diversos óleos essenciais estudados. Tais resultados confirmaram os resultados obtidos por nós em um estudo prévio e apresentado no Capítulo 2, no qual o *E. faecalis* foi a bactéria mais resistente aos diversos óleos essenciais e/ou misturas avaliadas.

Uma falta de atividade dos óleos essenciais sobre bactérias probióticas do gênero *Lactobacillus*, tais como o *L. plantarum*, *L. acidophilus* (SI et al., 2006), *L. rhamnosus*, *L. salivarius* e *L. reuteri* (MATHLOUTHI et al., 2012) também já foi observado. Contudo, este efeito pode ser considerado benéfico, quando o objetivo é o emprego dos óleos como substitutos de antibióticos utilizados como promotores de crescimento, uma vez que é desejável que tais óleos não apresentem ou apresentem fraca inibição de bactérias probióticas. O objetivo deste estudo foi avaliar a atividade antibacteriana de um óleo essencial de citrus (Orange Oil Phase Essence) e da mistura composta pelos óleos essenciais de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* sobre a bactéria patogênica *E. faecalis* e a probiótica *L. rhamnosus*, mediante a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e a Concentração Bactericida Mínima (CBM). O Orange Oil Phase Essence e a mistura *E. globulus/P. pseudocaryophyllus* foram selecionados para este estudo, com base nos resultados do Capítulo 2 (óleos essenciais ou misturas de melhor desempenho) e da disponibilidade de óleos essenciais em nosso estoque.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Eucalyptus globulos* e *Pimenta pseudocaryophyllus* foram obtidos a partir de folhas de frescas dessas espécies vegetais, as quais, foram coletadas na Estação Experimental de Ciências Florestais de Itatinga ESALQ/USP - São Paulo/Brasil (22°59'34.8"S 48°41'14.4"W) e na cidade de Registro - São Paulo/Brasil (24° 29' 16" S, 47° 50' 38" W), respetivamente. Assim, a extração dos óleos essenciais foi realizada a partir das folhas coletadas dessas plantas pelo processo de hidrodestilação por 4 horas utilizando um destilador tipo Clevenger. A proporção do material vegetal e água destilada foi de 1:5. O volume de cada óleo essencial coletado foi mensurado, desidratado através da passagem por uma camada de sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e armazenados em um frasco âmbar mantido sob refrigeração (4 °C) e ao abrigo da luz até sua utilização.

O óleo de citros recebeu a denominação de Orange Oil Phase Essence. Este óleo foi obtido da linha de produção de uma fábrica de processamento de laranja para obtenção de suco, localizada no Estado de São Paulo, Brasil. Este óleo foi caracterizado por possuir 87,22% de limoneno (Resultado do Capítulo 2 – Tabela 2.5)

3.2.2 Isolados bacterianos

As linhagens bacterianas avaliadas no presente trabalho foram linhagens padrões pertencentes à American Type Culture Collection (ATCC): *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (patogênica) e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 (probiótica). As bactérias foram ativadas em Ágar TSA (Tryptic soy agar) a 37°C por 18-20 horas e em Ágar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) a 30°C por 48 horas para o *E. faecalis* e *L. rhamnosus*, respectivamente. Após a ativação as bactérias foram repicadas em caldo BHI (*E. faecalis*) e caldo MRS (*L. rhamnosus*) suplementado com 30% de glicerol, e após o período de incubação foram mantidas a -20 °C até sua utilização.

3.2.3 Avaliação *in vitro* da atividade antibacteriana

3.2.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em microplaca de 96 poços seguindo os protocolos M07-A9 Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico, da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012) e M45-A2 Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição e Disco Difusão de Bactérias Raramente Isoladas ou Fastidiosas (CLSI, 2010).

Para a avaliação, o inóculo padrão de cada bactéria foi preparado em solução salina de cloreto de sódio 0,85%, a partir de colônias vivas de cada espécie bacteriana contidas em uma placa de Ágar TSA (*E. faecalis*) ou MRS (*L. rhamnosus*) na densidade óptica do padrão 0,5 Mc Farland (0,08 - 0,1 a 625 nm), correspondente a 10^8 UFC/mL. Este inóculo padrão foi diluído 1:100 para obter-se um inóculo de 1×10^6 UFC/mL (Inóculo Final).

A solução estoque do óleo Orange Oil Phase Essence e da mistura *E. globulus*/*P. pseudocaryophyllus* (1:1) foram preparadas à concentração 29,6 mg/ml (3,29%) com Caldo Müeller Hinton (*E. coli*) ou MRS (*L. plantarum*), utilizando Tween 80 como emulsificante (3,29%). A partir da solução estoque do óleo ou mistura foram feitas as diluições duplas seriadas em uma faixa de 14,80 a 0,116 mg/mL ao longo do eixo Y da microplaca. Para isso, foram colocados inicialmente 180 µL de caldo Mueller Hinton ou MRS em todos os poços destinados a conter as concentrações do óleo ou mistura e 180 µL da solução estoque foram colocados somente no primeiro poço, a partir do qual, se realizaram as diluições duplas seriadas. Vinte microlitros do inóculo final foram adicionados aos poços que continham as concentrações do óleo ou mistura, sendo o volume final de cada poço de 200 µL e a população bacteriana de 2×10^4 UFC/poço (10^5 UFC/mL). Foram utilizados um controle do meio de cultura (200 µL Caldo MH ou MRS), um controle de crescimento (180 µL de caldo + 20 µL do inóculo), um controle do emulsificante Tween 80 (200 µL de caldo com Tween 80 + 20 µL do inóculo) e um controle de crescimento no emulsificante (180 µL de caldo com Tween 80 + 20 µL do inóculo). Assim, o arranjo das microplacas seguiu a distribuição conforme apresentada na Figura 3.1. As avaliações foram realizada em triplicata. As placas foram incubadas no leitor de microplaca com leituras de absorbância (Vitor™

X3, PerkinElmer) a 37°C por 24 horas para *E. faecalis* e a 30°C por 32 horas para *L. rhamnosus*. Durante a incubação, a cada hora foram realizadas leituras da absorbância a 600 nm, com as quais foram construídas curvas de sobrevivência. Após o período de incubação para obtenção da curva de sobrevivência, as placas foram utilizadas para executar o teste de crescimento bacteriano. Assim, adicionou-se 25 µL/poço de solução de resazurina (0,0135% m/v), como corante indicador do crescimento microbiano, sendo o crescimento bacteriano evidenciado pela mudança na cor de azul da resazurina a rosa da resofurina (PEREIRA et al., 2014). A CIM foi estabelecida como a concentração mais baixa do óleo essencial ou mistura que inibiu o crescimento bacteriano visível.

Figura 3.1- Arranjo da microplaca (teste de microdiluição) para testar a atividade antibacteriana do Orange Oil Phase Essence e da mistura *E. globulus* + *P. pseudocaryophyllus*

3.2.3.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da concentração bactericida mínima (CBM) foi realizada a partir dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível. Assim, retirou-se uma alíquota de 100µL de cada poço e semeou-se superficialmente em ágar Muller-Hinton ou MRS, dependendo da bactéria utilizada. Após o período de incubação, 18-20 h a 37°C para *E. faecalis* e 48 h a 30°C para o *L. rhamnosus*, foi definida a concentração

bactericida mínima como a menor concentração do óleo essencial capaz de causar a inativação total da bactéria representada pela ausência de crescimento de colônias no ágar.

3.2.4 Determinação da composição química dos óleos essenciais por GC/MS

A caracterização da composição química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas, utilizando um Cromatógrafo Gasoso equipado com um detector de massas GC/MS QP2010 Plus – SHIMADZU, com uma coluna cromatográfica capilar Difenil Dimetil polissiloxano (5% *diphenyl* e 95% *dimethyl polysiloxane*), com 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm, modelo Rtx®-5MS (RESTEK). A programação da temperatura estabelecida para o forno iniciou-se com 50°C por 1,5 min, elevação de 4°C/min até 200°C, e então elevação de 10°C/min até 240°C, permanecendo nesta temperatura por 7 min. A temperatura do injetor foi de 240°C e da fonte de íons e interface de 220°C. A injeção foi feita no modo “Split” e o volume de amostra injetado foi de 1 µL. A razão do “Split” foi de 1:200. O Hélio foi utilizado como gás de arraste a uma vazão de 1,2 mL/min. O detector de massas operou no modo scan com faixa de varredura de 40 a 500 m/z. Os compostos voláteis foram identificados através da comparação entre os índices de Kovats (IK) calculados e observados em bibliotecas existentes da literatura, e entre os respectivos espectros de massa. Somente picos com presença maior que 1% da área total do cromatograma foram identificados.

3.3 Resultados

3.3.1 Atividade Antibacteriana

3.3.1.1 Curvas de sobrevivência

As curvas de sobrevivência obtidas para as avaliações dos óleos de Orange Oil Phase Essence e da mistura (*E. globulus* + *P. pseudocaryophyllus*), sobre as bactérias *E. faecalis* e *L. rhamonusus* são apresentadas nas Figuras de 3.2 à 3.5.

Analisando as Figuras 3.2 (B) e 3.4 (B) observamos que o emulsificante Tween 80 produziu uma mudança nas curvas de sobrevivência do *E. faecalis*. Esta mudança foi visível na fase estacionária do crescimento desta bactéria. Em todas as concentrações avaliadas do Tween 80 observou-se que foi produzido um decréscimo da população bacteriana na fase estacionária (curvas decrescentes) em comparação com a curva de crescimento do *E. faecalis* sem a presença do emulsificante. Contudo, na dose mais reduzida (0,116 mg/mL) do Tween 80 foi observado uma recuperação do crescimento da população bacteriana a partir das 19-20h de incubação. Apesar da interferência do emulsificante sobre a população bacteriana do *E. faecalis* foi possível observar-se que as doses crescentes do óleo e da mistura produziram efeito antibacteriano sobre a população desta bactéria, atrasando o início da fase exponencial e diminuindo a capacidade de reprodução da população bacteriana durante a fase exponencial. O Tween 80 nas diversas concentrações avaliadas, não mostrou nenhum efeito sobre crescimento do *L. rhamnosus* (Fig. 3.3 e 3.5). Em nosso estudo, o Tween 80 foi utilizado, apesar de ter mostrado esse efeito antibacteriano sobre *E. faecalis*, uma vez que outros emulsificantes como Tween 20, DMSO (Dimetilsulfóxido) e lecitina, avaliados previamente (resultados não mostrados), foram ineficazes na emulsificação dos óleos essenciais ou tinham mostrado uma maior atividade antibacteriana.

As curvas produzidas às diferentes concentrações do Orange Oil Phase Essence mostraram que à concentração 3,70 mg/mL (0,411 % v/v), este óleo apresentou uma ação antibacteriana seletiva, pois provocou uma inibição do crescimento do *E. faecalis* até às 9 horas de incubação e mesmo após o crescimento reduziu a população bacteriana ao final da fase exponencial, resultando em uma curva de sobrevivência com valores de absorbância menores do que as curvas obtidas com concentrações mais reduzidas deste óleo e mesmo da curva de crescimento desta bactéria sem exposição ao óleos (Fig. 3.2 C). Por outro lado, nessa mesma concentração o *L. rhamnosus* não foi mais inibido após 20 horas de incubação recuperando rapidamente seu crescimento e atingindo uma população final na fase exponencial similar à produzida pela bactéria sem a presença do óleo (Fig. 3.3 C).

Figura 3.2 – (A) Curva de crescimento normal do *E. faecalis*, (B) Curvas de crescimento da *E. faecalis* submetida às concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência da *E. faecalis* submetida a oito doses do Orange Oil Phase Essence

Figura 3.3 – (A) Curva de crescimento normal do *L. rhamnosus*, (B) Curvas de crescimento do *L. rhamnosus* submetido à concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do *L. rhamnosus* submetido a oito doses do óleo essencial Orange Oil Phase Essence

Figura 3.4 – (A) Curva de crescimento normal do *E. faecalis*, (B) Curvas de crescimento do *E. faecalis* submetido à concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do *E. faecalis* submetido a oito doses do mistura *E. globulus* + *P. pseudocaryophyllus*

Figura 3.5 – (A) Curva de crescimento normal do *L. rhamnosus*, (B) Curvas de crescimento do *L. rhamnosus* submetido à concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do *L. rhamnosus* submetido a oito doses da mistura *E. globulus* + *P. pseudocaryophyllus*.

Portanto, observou-se uma menor atividade na inibição desta bactéria probiótica. Já a mistura de óleos na dose de 3,70 mg/mL provocou sobre o *E. faecalis* um efeito antibacteriano similar ao produzido pelo Orange Oil Phase Essence (Fig. 3.4 C), mas sobre o *L. rhamnosus* produziu um efeito mais acentuado, permitindo somente um ligeiro crescimento ao final do período de incubação, 31 horas (Fig. 3.5 C). Na dose mais elevada avaliada de 14,80 mg/mL não foi possível observar valores de absorbância que denotassem a existência de crescimento bacteriano, quando o óleo ou a mistura foram avaliados sobre o crescimento de *E. faecalis* e *L. rhamnosus*. Este comportamento sugere que o óleo e a mistura possam, nas doses maiores que 3,70 e inferiores a 14,80 mg/mL, ser utilizados em longo períodos de incubação (> 20h), para inibir o crescimento da bactéria patogênica *E. faecalis* sem afetar o crescimento da bactéria probiótica *L. rhamnosus*.

3.3.1.2 Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima

Os valores das CIMs e CBMs para o óleo Orange Oil Phase Essence e para a mistura (*E. globulus* + *P. pseudocaryophyllus*), sobre a bactéria patogênica *E. faecalis* e a probiótica *L. rhamnosus* são apresentados na Tabela 3.1.

Tabela 3.1 – Atividade antibacteriana do Orange Oil Phase Essence e da mistura *E. globulus* + *P. pseudocaryophyllus* sobre *E. faecalis* e *L. rhamnosus*

Espécie bacteriana	Orange Oil Phase Essence			Mistura <i>E. globulus</i> + <i>P. pseudocaryophyllus</i>		
	CIM (mg/mL)		CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)		CBM (mg/mL)
	CS ¹	Rz ²		CS ¹	Rz ²	
<i>E. faecalis</i>	14,8	> 14,8	> 14,8	14,8	14,8	> 14,8
<i>L. rhamnosus</i>	14,8	14,8	> 14,8	7,4	7,4	14,8

¹ Curvas de sobrevivência

² Teste de resazurina

Nota-se que para a bactéria *E. faecalis* não foi possível observar uma CBM quando o Orange Oil Phase Essence ou a Mistura de óleos foi utilizada. Já a CIM foi possível observar claramente quando a mistura foi utilizada na dose mais elevada de 14,8 mg/mL (1,645%), por ambas as metodologias, curva de sobrevivência e teste da rezasurina, mostrando que nesta concentração da mistura o crescimento bacteriano da *E. faecalis* foi inibido totalmente, mas as células bacterianas não foram inviabilizadas. Contudo, quando o óleo Orange Oil Phase Essence foi utilizado a CIM

foi visível ao se observar as curvas de sobrevivência, mostrando que a dose mais elevada 14,8 mg/mL (1,645%) poderia ser considerada a CIM (Fig. 3.2). Entretanto, ao aplicar-se o teste da resazurina observou-se que todas as doses do óleo permitiram algum crescimento bacteriano (Fig. 3.6). Assim, utilizando o teste da resazurina não foi possível observar-se uma CIM para este óleo frente a esta bactéria. Como o teste de resazurina é o teste mais frequentemente utilizado para identificar o crescimento bacteriano de forma direta (COS et al., 2006), considerou-se neste estudo os resultados da resazurina como o mais apropriado.

Figura 3.6 – Teste de resazurina (A) *E. faecalis* sometido às concentrações do Orange Oil Phase Essence, (B) *E. faecalis* sometida às concentrações da mistura (*E. globulus* + *P. pseudocaryophyllus*), (C) *L. rhamnosus* submetido às concentrações do Orange Oil Phase Essence, (D) *L. rhamnosus* submetido às concentrações da mistura (*E. globulus* + *P. pseudocaryophyllus*)

Em relação à sensibilidade da bactéria *L. rhamnosus* ao óleo Orange Oil Phase Essence e a mistura observou-se que as CIMs foram de 14,8 mg/mL (1,645% v/v) e

7,4 mg/mL (0,823 % v/v), respectivamente. Ambas as metodologias, curva de sobrevivência (Fig. 3.3 C e 3.5 C) e o teste de rezasurina (3.6 C e D) coincidiram na determinação da CIM para esta bactéria. A mistura foi a mais prejudicial para o *L. rhamnosus*, além de ser inibitória, foi bactericida (CBM) a 14,8 mg/mL (1,645 % v/v) (Tabela 3.1). Portanto, o *L. rhamnosus* foi mais sensível à ação antibacteriana do óleo e da mistura.

3.3.2 Composição química

A composição química do óleo Orange Oil Phase Essence já foi apresentada no Capítulo 2, sendo este óleo caracterizado pela presença do Limoneno como composto majoritário (87,22%). A composição dos óleos que constituíram as misturas *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* são apresentadas na Tabela 3.2. Observa-se que o Chavibetol foi o composto majoritário do óleo da *P. pseudocaryophyllus* e o 1,8 cineol do óleo de *E. globulus*.

Tabela 3.2 - Composição química dos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus* e *Pimenta pseudocaryophyllus*

Compostos ¹	TR ²	IK ³	<i>E. globulus</i> (%) ⁴	<i>P. pseudocaryophyllus</i> (%) ⁴
α -thujene	8.267	929	-	1,86
α -pineno	8.491	936	4,63	6,41
β -pineno	9.917	980	-	7,62
β -mirceno	10.367	994	-	1,68
α -felandreno	10.850	1008	-	4,02
δ -3-careno	11.059	1014	-	1,85
α -terpineno	11.283	1020	-	1,13
p-cimeno	11.559	1028	5,35	6,73
Sylvestrene	11.717	1032	-	3,29
Limoneno	11.768	1034	6,38	-
1,8 cineol (Eucaliptol)	11.883	1037	83,65	11,19
trans- β -ocimeno (E- β -ocimeno)	12.375	1051	-	1,78
γ -terpineno	12.775	1062	-	3,08
Terpinoleno	13.849	1092	-	6,40
Terpinen-4-ol	17.059	1183	-	2,57
Chavibetol	23.283	1367	-	29,24
Eugenol	23.642	1378	-	8,32
Metileugenol	24.684	1411	-	2,85
Total			100,00	100,00

¹ Identificado por CG/MS, ² Tempo de retenção obtido pela coluna capilar Rxi-5ms, ³ Índices de Kovats calculados, ⁴ Quantidades relativas dos compostos identificados com base na área de cada pico no cromatograma.

3.4 Discussão

O óleo derivado de citros Orange Oil Phase Essence apresentou alguma atividade antibacteriana sobre *E. faecalis* e *L. rhamnosus*. Contudo, esta atividade foi diferente para as bactérias na faixa de concentração avaliada. O *E. faecalis* foi mais resistente a ação do óleo de citros, pois a CIM para esta bactéria pôde ser determinada somente pelas curvas de sobrevivência, enquanto para o *L. rhamnosus* a CIM foi determinada tanto pela curva de sobrevivência quanto pelo teste da resazurina. O teste da resazurina é mais sensível à presença de crescimento microbiano que a leitura de absorbância utilizada na construção da curva de sobrevivência. Para que os primeiros indícios de turbidez existam deve haver mais de um milhão de células por mililitro no meio, sendo preciso haver de 10 a 100 milhões de células por mililitro para que a suspensão bacteriana se torne turva o bastante para ser detectada em um espectrofotômetro (TORTORA; FUNKE; CASE, 2007). Como a população bacteriana utilizada no estudo foi de 10^5 UFC/mL, é possível que ao término do tempo de incubação na avaliação da dose de 14,80 mg/mL o *E. faecalis* estivesse começando a reproduzir, e assim a população de células bacterianas foi possível de ser detectada somente pelo teste da resazurina, mas não pelo absorbância. Já a população de *L. rhamnosus*, por ser mais sensível não apresentou nenhum crescimento bacteriano e assim as duas metodologias puderam demonstrar que a concentração de 14,80 mg/mL poderia ser considerada como a CIM.

Diversos estudos com óleos essenciais de citros reportaram que estes óleos foram efetivos na inibição de espécies de *Enterococcus*, conseguindo inclusive determinar a CIM e CBM, após 24 horas de aplicação dos óleos (ESPINA et al., 2011; FISHER, PHILLIPS, 2009a). Assim, os óleos essenciais de laranja (*Citrus sinensis*), de limão (*Citrus lemon*) e tangerina (*Citrus reticulata*) mostraram ser inibitórios para *E. faecium* a 0,2%; 0,05% e 0,2% v/v, respectivamente. Além disso, também foram bactericidas a 0,2% v/v; 0,5% e 0,2%, respectivamente. Estes óleos foram caracterizados pela alta concentração de limoneno, entre 59 a 85% (ESPINA et al., 2011). Do mesmo modo, misturas de óleos cítricos também mostraram ser efetivos na inibição do *E. faecalis*. Fisher e Phillips (2009a) reportaram que a mistura (1:1) dos óleos de laranja (*citrus sinensis*) e bergamota (*Citrus bergamia*) mostrou ser a mais efetiva na inibição desta bactéria em comparação aos óleos individuais e a outras misturas de óleos cítricos, apresentando a CIM mais baixa para esta bactéria (0,5 %

v/v). O mecanismo de ação pelo qual esta mistura causa a inibição de espécies de *Enterococcus*, poderia ser devido à penetração da mistura dentro das células enterocócicas aumentando a permeabilidade da membrana celular e reduzindo a sínteses de ATP dentro destas células (FISHER E PHILLIPS, 2009b).

Autores como Espina et al. (2011) relatam que a atividade antibacteriana de óleos essenciais de citros não pode ser atribuída ao limoneno, uma vez que a atividade antimicrobiana destes óleos em muitos casos é bastante diferente, apesar de todos apresentarem como característica comum a presença do limoneno como composto majoritário. Assim, é possível que a atividade antibacteriana esteja relacionada à presença de compostos minoritários, como os monoterpenos oxigenados, que poderiam atuar individualmente ou ter uma interação conjunta sinérgica. Porém, Van Vuuren e Viljoen (2007) reportaram que os enantiômeros (+)-limoneno e (-)-limoneno isoladamente possuíam atividade antibacteriana sobre um grupo de bactérias gram-positivas e gram-negativas, das quais o *E. faecalis* foi inibido à CIM de 27 mg/mL para ambos os compostos. Além disso, quando ambos enantiômeros interagiram em uma mistura 1:1, a CIM para esta bactéria foi mais reduzida (8 mg/mL), mostrando que a interação de ambos enantiômeros potencializava a sua atividade antibacteriana sobre o *E. faecalis*. Contudo, é possível que o composto majoritário de um óleo essencial, como o limoneno, isoladamente possa apresentar atividade antibacteriana, mas quando constituindo um óleo essencial ele pode não ser igualmente ativo, pois se encontra interagindo com outros compostos que podem reduzir sua atividade, a ponto de não ser o responsável dentro do óleo pela atividade antibacteriana apresentada pelo óleo. Outros compostos presentes em menor concentração que estejam interagindo podem ser os responsáveis por esta atividade. Por exemplo, monoterpenos como Linanol e Citral, que são constituintes presentes em menores quantidades nos óleos cítricos, isoladamente já mostraram ser superiores na inibição de *E. faecalis* do que óleos cítricos e misturas cítricas, pois CIMs mais baixas foram observadas para estes compostos, sendo 0,125% e 0,06%, respectivamente (FISHER E PHILLIPS, 2009a).

A mistura constituída pelos óleos de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* foi mais antibacteriana sobre *E. faecalis* e *L. rhamnosus* que o óleo de citros, pois nas doses avaliadas foi possível determinar-se uma CIM após 24 horas de exposição. O efeito de combinações dos óleos essenciais na mesma proporção, para inibir bactérias

patogênicas já foi relatado, mostrando uma atividade antimicrobiana superior quando dois óleos essenciais interatuam juntos (DE RAPPER et al., 2012, 2013).

Poucos estudos avaliando a atividade antibacteriana de misturas binárias de óleos sobre o *E. faecalis* são reportados. GOÑI et al. (2009) reportaram que a mistura (1:1) dos óleos essenciais de *Cinnamom zeylanicum* (canela) e *Syzygium aromaticum* (cravo da Índia), mostrou ser efetiva na fase de vapor na inibição do *E. faecalis*, apresentando uma CIM de 90 mg/L de ar. Estudos sobre a mistura de *E. globulus* + *P. pseudocaryophyllus* atuando na inibição bacteriana não foram encontrados.

Por outro lado, o potencial antimicrobiano do óleo de *E. globulus* atuando individualmente tem sido reportado (MOREIRA et al., 2005; MULYANINGSIH et al., 2011). Este óleo é caracterizado pela presença de 1,8 cineol (Eucaliptol) como o seu composto majoritário (TYAGI; MALIK., 2011), composto este que também foi identificado como majoritário em nosso estudo (Tabela 3.2). O óleo essencial dos frutos de *E. globulus* foi reportado como inibitório (1 mg/mL) e bactericida (2 mg/mL), para espécies de *E. faecalis* VRE e *E. faecalis* ATCC 29212 (MULYANINGSIH et al., 2010). O 1,8 cineol, isoladamente também mostrou ser efetivo na inibição do *E. faecalis* ATCC 29212 apresentando uma CIM de 23 mg/mL, porém esta bactéria foi a mais resistente à ação deste composto, pois a CIM foi a mais alta em comparação a outras bactérias patogênicas (VAN VUUREN E VILJOEN, 2007).

Nos estudos avaliando a atividade antibacteriana do óleo de *P. pseudocaryophyllus*, foi observada uma atividade na inibição de bactérias gram-positivas como *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis* e sobre bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (LIMA et al., 2006; CUSTÓDIO et al., 2010). O Chavibetol tem sido identificado como o composto majoritário neste óleo (DOS SANTOS et al., 2009; BARATA et al., 2011), assim como em nosso estudo (Tabela 3.2).

Referente ao *L. rhamnosus*, o Orange Oil Phase Essence e a mistura, mostraram uma maior atividade na inibição desta bactéria probiótica, pois CIMs mais baixas foram observadas para esta bactéria. Inclusive a mistura mostrou ser mais prejudicial para o *L. rhamnosus*, pois para esta bactéria foi determinada uma concentração bactericida. Contudo, Si et al. (2006) reportaram que o efeito antibacteriano, de óleos essenciais e/ou compostos isolados, foi mais baixo sobre as bactérias benéficas isoladas do trato gastrointestinal de suínos, já que observaram uma menor inibição destas bactérias por parte dos óleos e/ou compostos, sendo duas

espécies de *L. plantarum* as mais tolerantes. Di Pasqua et al. (2005) reportaram também uma fraca (CIMs > 1% v/v) ou nenhuma ação antibacteriana de diversos óleos essenciais sobre bactérias ácido lácticas benéficas, como *L. plantarum* e *L. delbrueckii* subesp. *lactis*.

Contudo, observando-se as curvas de sobrevivência foi possível notar que a concentração de 3,70 mg/mL, do Orange Oil Phase Essence exerceu uma maior ação inibitória sobre o *E. faecalis* em comparação ao *L. rhamnosus*, uma vez que provocou uma fase de adaptação mais prolongada e reduziu a população do *E. faecalis* ao final da fase exponencial (A curva apresentou valores de absorbância menores que os valores observados na curva de crescimento sem a presença do óleo). Isso, sugere que a uma concentração mais reduzida o Orange Oil Phase Essence foi mais efetivo na inibição da bactéria patogênica do que na inibição da bactéria probiótica, já que esta última atingiu seu crescimento normal após um atraso da fase exponencial, sem praticamente reduzir sua população ao final da fase exponencial.

A avaliação das curvas de sobrevivência também permitiu notar que o Tween 80 apresentou um efeito inibitório na fase estacionária do crescimento do *E. faecalis*. O Tween 80 é um detergente que é utilizado como emulsificante para melhorar a dispersão dos óleos essenciais em estudos da avaliação de sua atividade antimicrobiana. Estudos reportaram (REMMAL et al., 1993a) que emulsificantes como Tween 80 e etanol interferiam na estimativa da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano e canela, produzindo uma diminuição da atividade antimicrobiana destes óleos, uma vez que foram observados CIMs e CMBs mais altas quando os emulsificadores Tween 80 ou Etanol foram utilizados em comparação quando ágar foi o emulsificante. Esse decréscimo da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais foi explicado por Remmal et al. (1993b) relatando que os emulsificantes e/ou solventes podem produzir mudanças na permeabilidade da membrana celular bacteriana e/ou nas interações entre esses agentes e os componentes dos óleos essenciais, o qual, diminui a eficiência antibacteriana dos componentes ou princípios ativos dos óleos essenciais. Embora, no nosso estudo o Tween 80, tenha causado algum efeito no crescimento bacteriano do *E. faecalis*, pôde ser observado que o emulsificante não interferiu na atividade antibacteriana do óleo cítrico e/ou da mistura, já que o Tween 80, o óleo e a mistura foram ativos em fases diferentes do crescimento da bactéria.

3.5 Conclusão

O óleo cítrico e a mistura *E. globulus*/*P. pseudocaryophyllus* apresentaram atividade antibacteriana sobre a bactéria patogênica e probiótica avaliadas neste estudo. A mistura foi a mais efetiva devido a que concentrações mais reduzidas dela foram necessárias para produzir a inibição (CIM) ou inativação total (CBM) de ambas as bactérias. A construção de curvas de sobrevivência permitiu observar que o óleo Orange Oil Phase Essence apresentou um efeito antibacteriano seletivo, menor ação sobre a bactéria patogênica e menor ação sobre a bactéria probiótica, a uma concentração mais reduzida da CIM, (3,70 mg/mL). Além disso, as curvas de sobrevivência mostraram que o emulsificante Tween 80, utilizado comumente para dispersar óleos essenciais nos meios de cultura, apresentou algum efeito antibacteriano sobre a bactéria patogênica *E. faecalis*. Mas isto, não influenciou na estimativa da atividade antibacteriana do óleo cítrico e da mistura, já que eles e o Tween 80 tiveram pontos alvos diferentes sobre o crescimento bacteriano.

Referencias

AARESTRUP, F.M.; AHRENS, P.; MADSEN, M.; PALLESEN, L.V.; POULSEN, R. L.; WESTH, H. Glycopeptide susceptibility among Danish *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis* isolates of animal and human origin and PCR identification of genes within the *VanA* cluster. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda-Maryland, v. 40, n. 8, p. 1938-1940, 1996.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; MARTÍNEZ, M.A. Probiotics for animal nutrition in the European Union. Regulation and safety assessment. **Regulatory toxicology and pharmacology**, Duluth-Minnesota, v. 45, n. 1, p. 91-95, 2006.

BARATA, L.E.; DOS SANTOS, B.C.; MARQUES, F.A.; BARONI, A.C.; DE OLIVEIRA, P.R.; EINLOFT, P.; GUERRERO JR, P.G. Seasonal Variation of the Volatile Constituents from Leaves of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes). **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream-Illinois, v. 23, n. 4, p. 54-57, 2011.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antibiotic resistance threats in the United States. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/drugresistance/threat-report-2013/pdf/ar-threats-2013-508.pdf#page=67>>. Acesso em: 5 out. 2015.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Antibiotic/ Antimicrobial Resistance. Disponível em: < <http://www.cdc.gov/drugresistance/>>. Acesso em: 3 out 2015.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE-CLSI. Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Proposed Guideline. CLSI document M45-P, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE-CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard. 9th ed. CLSI document M07-A9, 2012.

COS, P.; VLIETINCK, A.J.; BERGHE, D.V.; MAES, L. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of-concept'. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

CUSTÓDIO, D.L.; BURGO, R.P.; MORIEL, B.; BARBOSA, A.D.M.; REZENDE, M. I.; DANIEL, J.F.D.S.; PINTO, J.P.; BIANCHINI, E.; FARIA, T.D.J. Antimicrobial activity of essential oils from *Pimenta pseudocaryophyllus* and *Tynanthus micranthus*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 53, n. 6, p. 1363-1369, 2010.

DE RAPPER, S.; KAMATOU, G.; VILJOEN, A.; VAN VUUREN, S. The *in vitro* antimicrobial activity of *Lavandula angustifolia* essential oil in combination with other aroma-therapeutic oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2013, p. 852049, 2013.

DE RAPPER, S.; VAN VUUREN, S.F.; KAMATOU, G.P.P.; VILJOEN, A.M.; DAGNE, E. The additive and synergistic antimicrobial effects of select frankincense and myrrh oils—a combination from the pharaonic pharmacopoeia. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 54, n. 4, p. 352-358, 2012.

DI PASQUA, R.; DE FEO, V.; VILLANI, F.; MAURIELLO, G. *In vitro* antimicrobial activity of essential oils from Mediterranean Apiaceae, Verbenaceae and Lamiaceae against foodborne pathogens and spoilage bacteria. **Annals of microbiology**, Milan, v. 55, n. 2, p. 139-143, 2005.

DIAZ-SANCHEZ, S.; D'SOUZA, D.; BISWAS, D.; HANNING, I. Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. **Poultry Science**, Champaign-Illinois, v. 94, n 6, p. 1419-1430, 2015.

DOS SANTOS, B.C.; DA SILVA, J.C.T.; GUERRERO, P.G.; LEITÃO, G.G.; BARATA, L.E. Isolation of chavibetol from essential oil of *Pimenta pseudocaryophyllus* leaf by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, n. 19, p. 4303-4306, 2009.

ELAISSI, A.; SALAH, K.H.; MABROUK, S.; LARBI, K.M.; CHEMLI, R.; HARZALLAH-SKHIRI, F. Antibacterial activity and chemical composition of 20 *Eucalyptus* species' essential oils. **Food Chemistry**, London, v. 129, n. 4, p. 1427-1434, 2011.

ESPINA, L.; SOMOLINOS, M.; LORÁN, S.; CONCHELLO, P.; GARCÍA, D.; PAGÁN, R. Chemical composition of commercial citrus fruit essential oils and evaluation of their antimicrobial activity acting alone or in combined processes. **Food control**, Guildford, v. 22, n. 6, p.896-902, 2011.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. *In vitro* inhibition of vancomycin-susceptible and vancomycin-resistant *Enterococcus faecium* and *E. faecalis* in the presence of citrus essential oils. **British Journal of Biomedical Science**, London, v. 66, n. 4, p. 180, 2009a.

FISHER, K.; PHILLIPS, C. The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 106, n. 4, p. 1343-1349, 2009b.

FRIEDMAN, M. Antibiotic-Resistant Bacteria: Prevalence in Food and Inactivation by Food-Compatible Compounds and Plant Extracts. **Journal of Agricultural And Food Chemistry**, Easton-Pennsylvania, v. 63, n. 15, p.3805-3822, 2015.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, London, v. 116, n. 4, p. 982-989, 2009.

HOOTON, S.P.; TIMMS, A.R.; CUMMINGS, N.J.; MORETON, J.; WILSON, R.; CONNERTON, I.F. The complete plasmid sequences of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium U288. **Plasmid**, New York, v. 76, p. 32-39, 2014.

IKE, Y.; TANIMOTO, K.; OZAWA, Y.; NOMURA, T.; FUJIMOTO, S.; TOMITA, H. Vancomycin-resistant enterococci in imported chickens in Japan. **The Lancet**, London, v. 353, n. 9167, p. 1854, 1999.

KHACHATOURIANS, G.G. Agricultural use of antibiotics and the evolution and transfer of antibiotic-resistant bacteria. **Canadian Medical Association Journal**, Ottawa, v. 159, n. 9, p. 1129-1136, 1998.

LIMA, M.E.L.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M.C M.; SOBRA, M.E.; MORENO, P R. H. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) LR Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo State-Brazil. **Pharmacologyonline**, Salerno, v. 3, p. 589-593, 2006.

MAASJOST, J.; MÜHLDOERFER, K.; DE JÄCKEL, S.C.; HAFEZ, H.M. Antimicrobial susceptibility patterns of *Enterococcus faecalis* and *Enterococcus faecium* isolated from poultry flocks in Germany. **Avian Diseases**, Kennett Square-Pennsylvania, v. 59, n. 1, p.143-148, 2015.

MATHLOUTHI, N.; BOUZAIENNE, T.; OUESLATI, I.; RECOQUILLAY, F.; HAMDY, M.; URDACI, M.; BERGAOUI, R. Use of rosemary, oregano, and a commercial blend of essential oils in broiler chickens: *in vitro* antimicrobial activities and effects on growth performance. **Journal of Animal Science**, Champaign-Illinois, v. 90, n. 3, p. 813-823, 2012.

McEWEN, S.A.; FEDORKA-CRAY, P.J. Antimicrobial use and resistance in animals. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago-Illinois, v. 34, n. Suppl.3, p. S93-S106, 2002.

MOREIRA, M.R.; PONCE, A.G.; DEL VALLE, C.E.; ROURA, S. I. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT-Food Science and Technology**, London, p. 38, n. 5, p. 565-570, 2005.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINK, M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8 cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, Jena, v. 17, n. 13, p. 1061-1066, 2010.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; REICHLING, J.; WINK, M. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharmaceutical biology**, Lisse, v. 49, n. 9, p. 893-899, 2011.

PEREIRA, V.; DIAS, C.; VASCONCELOS, M.C.; ROSA, E.; SAAVEDRA, M.J. Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 52, p. 1-7, 2014.

RAJASHEKARA, G.; HAVERLY, E.; HALVORSON, D. A.; FERRIS, K.E.; LAUER, D. C.; NAGARAJA, K. V. Multidrug-resistant *Salmonella* Typhimurium DT104 in poultry. **Journal of Food Protection**, Des Moines-Iowa, v. 63, n. 2, p. 155-161, 2000.

REMMAL, A.; BOUCHIKHI, T.; TANTAOUI-ELARAKI, A.; ETTAYEBI, M. Inhibition of antibacterial activity of essential oils by tween 80 and ethanol in liquid medium. **Journal de Pharmacie de Belgique**, Bruxelles, v. 48, n. 5, p. 352-356, 1993b.

REMMAL, A.; BOUCHIKHI, T.; RHAYOUR, K.; ETTAYEBI, M.; TANTAOUI-ELARAKI, A. Improved method for the determination of antimicrobial activity of essential oils in agar medium. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream-Illinois, v. 5, n. 2, p. 179-184, 1993b.

SI, W.; GONG, J.; TSAO, R.; ZHOU, T.; YU, H.; POPPE, C.; JOHNSON, R.; DU, Z. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 2, p. 296-305, 2006.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, C.L. Crecimiento microbiano, In: _____ Introducción a la Microbiología. Buenos Aires: Ed. Médica Panamericana, 2007. chap. 6, p. 182.

TYAGI, A K.; MALIK, A. Antimicrobial potential and chemical composition of *Eucalyptus globulus* oil in liquid and vapour phase against food spoilage microorganisms. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 1, p. 228-323, 2011.

VAN BOECKEL, T.P.; BROWER, C.; GILBERT, M.; GRENFELL, B.T.; LEVIN, S.A.; ROBINSON, T.P.; TEILLANT, A.; LAXMINARAYAN, R. Global trends in antimicrobial

use in food animals. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 112, n. 18, p. 5649-5654, 2015.

VAN VUUREN, S.F.; VILJOEN, A.M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1, 8-cineole alone and in combination. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 22, n. 6, p. 540-544, 2007.

YANG, Y.; IJI, P.A.; CHOCT, M. Dietary modulation of gut microflora in broiler chickens: a review of the role of six kinds of alternatives to in-feed antibiotics. **World's Poultry Science Journal**, Ithaca, v. 65, n. 1, p. 97-114, 2009.

4. EFEITO ANTIBACTERIANO INDIVIDUAL E COMBINADO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Eucalyptus globulus* E *Pimenta pseudocaryophyllus* SOBRE *Enterococcus faecalis* E *Lactobacillus rhamnosus*.

Resumo

Devido à preocupação do aumento de bactérias resistentes aos antibióticos, algumas alternativas naturais têm sido estudadas para substituir aos antibióticos usados na produção animal. Assim, os óleos essenciais têm recebido atenção para este propósito devido as suas propriedades antimicrobianas. No entanto, a atividade antimicrobiana pode ser diferente se os óleos essenciais (OEs) atuam isoladamente ou em combinação com outros OEs. Por outro lado, as bactérias probióticas do trato gastrointestinal são importantes para a saúde do animal e para o seu desempenho. Portanto, a atividade antibacteriana dos OEs deve ser tão baixa quanto possível sobre essas bactérias. O objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito antibacteriano individual e combinado de dois OEs, *Eucalyptus globulus* e *Pimenta pseudocaryophyllus* sobre a bactéria patogênica *Enterococcus faecalis* e sobre a bactéria probiótica *Lactobacillus rhamnosus*. O efeito antibacteriano individual dos dois OEs foi avaliada por determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM). A CIM foi determinada pelo método de microdiluição e a CBM por plaqueamento. O efeito antibacteriano combinado dos OEs foi avaliada por determinação do índice da Concentração Inibitória Fraccionada, usando o método de checkerboard. O OE mais seletivo foi escolhido para seguir com o estudo, e assim, a análise de Tempo de Morte (Time Kill) foi realizada. Além disso, um ensaio foi proposto para medir a sensibilidade bacteriana à exposição sequencial de uma mesma concentração do óleo essencial. Os OE individualmente mostraram diferente atividade antibacteriana, como observado nos valores da CIM para este óleo. O óleo de *P. pseudocaryophyllus* mostrou a melhor atividade sobre *E. faecalis* e *L. rhamnosus* do que *E. globulus*. O óleo de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* foram bactericidas para *E. faecalis* a 14,80 mg/mL e 7,4 mg/ml, respectivamente. Apenas o óleo de *P. pseudocaryophyllus* foi bactericida a 14,8 mg/mL para *L. rhamnosus*. Os valores do índice CIF mostraram que os OEs apresentaram melhor atividade antibacteriana quando eles atuaram individualmente e não combinados. Apesar da maior atividade antibacteriana do óleo de *P. pseudocaryophyllus*, foi menos seletivo do que *E. globulus* sobre a bactéria patogênica e probiótica. O óleo *E. globulus* mostrou, mediante a análise de Tempo de Morte, que pode matar a *E. faecalis* em 30 segundos de contato. Além disso, quando *E. faecalis* recebeu a mesma dose de 3,70 mg/mL (CIM/4) sequencialmente cada 3 horas, durante o período de 9 horas de incubação, a população bacteriana perdeu sua viabilidade após a segunda exposição, mas *L. rhamnosus* foi apenas parcialmente inibida durante o período total de incubação. Assim, incluso a uma concentração inferior a sua CIM, o óleo de *E. globulus* foi capaz de matar à bactéria patogênica e apenas inibir parcialmente à bactéria probiótica. Em conclusão, pelo seu potencial antibacteriano seletivo do óleo essencial de *E. globulus* poderia ser sugerido como alternativa aos antibióticos convencionais utilizados na alimentação animal.

Palavras-chaves: Atividade antibacteriana seletiva; Óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, Óleo essencial de *Pimenta Psedocaryophyllus*; CIF; *Enterococcus faecalis* e *Lactobacillus rhamnosus*.

Abstract

Due to the concern about the increase of antibiotic-resistant bacteria, some natural alternatives have been investigated to substitute antibiotics used in animal production. Thus, essential oils have received attention for this purpose due to their antimicrobial properties. However, antimicrobial activity may be different if essential oils (EOs) are considered acting alone or combined with other EOs. Otherwise, as gut-probiotic bacteria are beneficial for animal health and its performance, Therefore, EOs antibacterial activity must be as low as possible on those bacteria. The aim of this research was evaluate the individual and combined antibacterial effect of two EOs, *Eucalyptus globulus* and *Pimenta pseudocaryophyllus*, on pathogenic bacterium *Enterococcus faecalis* and probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus*. The individual antibacterial effect of two EOs, was evaluated by determination of Minimal Inhibitory Concentration (MIC) and Minimal Bactericidal Concentration (MBC). MIC was determined by microdilution method and MBC by plating. The combined antibacterial effect of EOs was evaluated by determination of Fractional Inhibitory Concentration (FIC) index using the checkerboard method. The more selective EO was chose to follow in the study, and so, Time Kill assay was performed. Moreover, an assay was proposed to measure the bacterial sensitivity to the sequential exposition of a same concentration of the essential oil. EOs when alone showed different antibacterial activity, as observed by their MIC values. The *P. pseudocaryophyllus* EO showed the better activity on *E. faecalis* and *L. rhamnosus* than *Eucalyptus globulus*. The *P. pseudocaryophyllus* oil and *E. globulus* oil were bactericidal to *E. faecalis* at 14.8 mg/mL and 7.4 mg/mL, respectively. Only *P. pseudocaryophyllus* oil was bactericidal at 14.8 mg/mL to *L. rhamnosus*. The FIC index values showed that EOs presented better antibacterial activity when they were considered alone and not combined. In spite of highest antibacterial activity of *P. pseudocaryophyllus* oil, it was less selective than *E. globulus* on pathogenic bacteria and probiotics bacteria. The *E. globulus* oil showed, by Time-kill assay that can kill to *E. faecalis* at 30 seconds of contact. Furthermore, when *E. faecalis* received the same dose 3.70 mg/mL (MIC/4) sequentially in each 3 hour, during 9 hour period of incubation, the bacteria population lost their viability after a second time exposition, but *L. rhamnosus* was just partially inhibited over the total period of incubation. Thus, even at lower concentration than its MIC, the *E. globulus* oil was able to kill the phatogenic bacterium and just partially inhibit to probiotic bacterium. In conclusion, for its selective antibacterial potential the *E. globulus* essential oil could be suggested as alternative to conventional antibiotics used in the animal feed.

Keywords: Antibacterial activity; *Eucalyptus globulus* essential oils; *Pimenta pseudocaryophyllus* essential oil; FIC; *Enterococcus faecalis* and *Lactobacillus rhamnosus*.

Resumen

Debido a la preocupación por el aumento de bacterias resistentes a los antibióticos, algunas alternativas naturales han sido estudiadas para sustituir a los antibióticos utilizados en la producción animal. De ese modo, los aceites esenciales han recibido atención para este propósito debido a sus propiedades antimicrobianas. No obstante, la actividad antimicrobiana puede ser diferente si los aceites esenciales (AEs) actúan individualmente o en combinación con otros AEs. Por otro lado, las bacterias probióticas del tracto gastrointestinal son importantes para la salud del animal y por su rendimiento. Por lo tanto, la actividad antibacteriana de los AEs debe ser lo mínimo posible sobre estas bacterias. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto antibacteriano individual y combinado de dos AEs, *Eucalyptus globulus* y *Pimenta pseudocaryophyllus* sobre la bacteria patógena *Enterococcus faecalis* y la bacteria probiótica *Lactobacillus rhamnosus*. El efecto antibacteriano individual de los dos AE fue evaluado mediante la determinación de la Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Concentración Bactericida Mínima (CBM). La CIM fue determinada por el método de microdilución y la CBM por plaqueamiento. El efecto antibacteriano combinado de los AE fue evaluado por determinación del índice de la Concentración Inhibitoria Fraccionada, utilizando el método de Checkerboard. El AE más selectivo fue elegido para continuar con el estudio, y así, fue realizado el análisis de Tiempo de Muerte (Time Kill). Además, se propuso un ensayo para medir la sensibilidad bacteriana a la exposición secuencial de una misma concentración del aceite esencial. Los AEs mostraron, individualmente, diferente actividad antibacteriana como se observa en los valores de las CIMs de los aceites. El aceite de *P. pseudocaryophyllus* mostró la mejor actividad antibacteriana sobre *E. faecalis* y *L. rhamnosus* que el aceite de *E. globulus*. El aceite de *P. pseudocaryophyllus* y *E. globulus* fueron bactericida para *E. faecalis* a 14,80 mg/mL y 7,4 mg/mL, respectivamente. Apenas el aceite de *P. pseudocaryophyllus* fue bactericida a 14,8 mg/mL para *L. rhamnosus*. Los valores del índice de la CIF mostraron que los AEs tuvieron mejor actividad antibacteriana cuando actuaron individualmente y no en combinación. A pesar de la mayor actividad antibacteriana del aceite de *P. pseudocaryophyllus*, este fue menos selectivo que el aceite de *E. globulus* sobre la bacteria patógena y probiótica. El aceite de *E. globulus*, mostró por el análisis de Tiempo de Muerte, que pudo matar a *E. faecalis* a los 30 segundos de contacto. Además, cuando *E. faecalis* recibió la misma dosis de 3,70 mg/mL (CIM/4) secuencialmente cada 3 horas durante el período de incubación de 9 horas, la población bacteriana perdió su viabilidad después de la segunda exposición, pero *L. rhamnosus* fue apenas inhibido parcialmente durante todo el período de incubación. Por lo tanto, incluso a una concentración por debajo de su CIM, el aceite de *E. globulus* fue capaz de matar a la bacteria patógena y sólo parcialmente inhibir a la bacteria probiótica. En conclusión, por su actividad antimicrobiana selectiva de aceite esencial de *E. globulus* podría ser sugerido como una alternativa a los antibióticos convencionales utilizados en la alimentación animal.

Palabras claves: Actividad antibacteriana selectiva; Aceite esencial de *Eucalyptus globulus*; Aceite esencial de *Pimenta pseudocaryophyllus*; CIF; *Enterococcus faecalis* y *Lactobacillus rhamnosus*.

4.1 Introdução

Os óleos essenciais têm gerado interesse no setor de produção animal orgânica e convencional devido a suas propriedades antimicrobianas. Assim, estão sendo estudados com o objetivo de ser uma alternativa para substituir aos antibióticos convencionais utilizados na alimentação animal, já que o uso dos antibióticos como melhoradores do desempenho foi proibido pela Comunidade Europeia a partir de 2006, pelo princípio da precaução quanto ao desenvolvimento de resistência bacteriana aos antibióticos (DIAZ-SANCHEZ et al., 2015). O setor de produção de suínos e aves, tem incluído antibióticos na alimentação destes animais para garantir o bom estado de saúde dos animais e promover o crescimento, obtendo assim melhor desempenho dos animais e redução da mortalidade por doenças entéricas subclínicas (GUARDABASSI; KRUSE, 2008). Estes efeitos biológicos benéficos dos antibióticos são relatados devido a sua atuação direta sobre o trato gastrointestinal dos animais, pois otimizam a composição da microbiota intestinal (DIBNER; RICHARDS, 2005). Estudos mostraram que os óleos essenciais atuam de maneira similar aos antibióticos, modulando a composição da microbiota intestinal dos animais (DIAZ-SANCHEZ et al., 2015). Portanto, esta característica abre a possibilidade de os óleos essenciais serem uma alternativa para substituir os antibióticos.

Os óleos essenciais têm mostrado propriedades antimicrobianas sobre espécies de bactérias resistentes a antibióticos, como o óleo de *E. globulus* e seus principais componentes, os quais, mostraram ser efetivos na inibição e inviabilização total de *Enterococcus faecalis* e *E. faecium* resistentes à Vancomicina, e *S. aureus* resistentes a Meticilina (MULYANINGSIH et al., 2010).

A *Pimenta pseudocaryophyllus* é uma planta nativa do Brasil, cujo óleo essencial recentemente tem ganhado interesse por ser rico em fenilpropanóides, como o chavibetol e metileugenol, que têm sido reportados como compostos bioativos (DOS SANTOS et al., 2009). Embora, os estudos das propriedades antimicrobianas do óleo essencial desta planta sejam poucos, os resultados mostram a efetividade deste óleo sobre diversas espécies bacterianas patogênicas (PAULA et al., 2012), pelo qual, surge o interesse por realizar estudos mais profundos de suas propriedades antimicrobianas individualmente e em combinação com outros óleos essenciais.

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser potencializada quando estão em combinação com outros óleos essenciais. Um método amplamente utilizado

para avaliar a atividade antibacteriana da combinação de dos óleos essenciais é o método conhecido como checkerboard, no qual diversas combinações de dois óleos essenciais podem ser avaliadas (BONAPECE et al., 2002). A partir deste método, é comum realizar o cálculo do índice da Concentração Inibitória Fraccionada (CIF), o qual, indica se o efeito antibacteriano produzido pela interação de dois óleos essenciais é sinérgico, aditivo, indiferente ou antagonista (BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito antibacteriano individual e combinado dos óleos essenciais de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* sobre a bactéria patogênica modelo *E. faecalis* ATCC 29212 e a bactéria probiótica modelo *L. rhamnosus* ATCC 7469.

4.2 Material e Métodos

4.2.1 Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Eucalyptus globulos* e *Pimenta pseudocaryophyllus* foram obtidos a partir de folhas frescas dessas espécies vegetais, as quais, foram coletadas na Estação experimental de ciências florestais de Itatinga ESALQ/USP - São Paulo/Brasil (22°59'34.8"S 48°41'14.4"W) e na cidade de Registro - São Paulo/Brasil (24° 29' 16" S, 47° 50' 38" W), respectivamente. Assim, a extração dos óleos essenciais foi realizada a partir das folhas coletadas dessas plantas pelo processo de hidrodestilação por 4 horas utilizando um destilador tipo Clevenger. A proporção do material vegetal e água destilada foi de 1:5. O volume de cada óleo essencial coletado foi mensurado, desidratado através da passagem por uma camada de sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄) e armazenados em um frasco âmbar mantido sob refrigeração (4 °C) e ao abrigo da luz até sua utilização.

4.2.2 Isolados bacterianos

As linhagens bacterianas testadas no presente trabalho foram linhagens padrões pertencentes à American Type Culture Collection (ATCC): *Enterococcus faecalis* ATCC 29212 (patogênica) e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 (probiótica). As bactérias foram ativadas em Agar TSA (Tryptic soy agar) a 37°C por

18-20 horas e em Agar MRS (Man, Rogosa and Sharpe) a 30°C por 48 horas para o *E. faecalis* e *L. rhamnosus*, respectivamente. Após a ativação as bactérias foram repicadas em caldo BHI (*E. faecalis*) e caldo MRS (*L. rhamnosus*) suplementado com 30% de glicerol e após o período de incubação foram mantidas a -20 °C até sua utilização.

4.2.3 Avaliação da atividade antibacteriana

A avaliação do efeito antibacteriano individual dos óleos essenciais de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* foi realizado através da determinação da Concentração Inibitória Mínima e Concentração Bactericida Mínima sobre *E. faecalis* e *L. rhamnosus*. O efeito antibacteriano da combinação de ambos óleos essenciais foi realizada mediante a determinação do índice da Concentração Inibitória Fraccionada (CIF) sobre as bactérias utilizadas. Após a avaliação dos resultados o óleo individual ou a combinação de ambos os óleos com o melhor desempenho foi selecionada para a realização da análise de Time Kill e Tolerância bacteriana a doses sequenciais do óleo ou combinação.

4.2.3.1 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A determinação da CIM foi realizada pelo método de microdiluição em uma microplaca de 96 poços seguindo os protocolos M07-A9 (CLSI, 2012) e M45-A2 (CLSI, 2010) da Clinical and Laboratory Standards Institute.

Para o teste, o inóculo padrão de cada bactéria foi preparado em solução NaCl 0,85%, a partir de colônias vivas de cada espécie bacteriana contidas em uma placa de Agar TSA (*E. faecalis*) ou MRS (*L. rhamnosus*) na densidade óptica do padrão 0,5 Mc Farland (0,08-0,1 a 625 nm) correspondente a 10^8 UFC/mL. Seguidamente, este foi diluído em 1:100 para obter um inóculo de 1×10^6 UFC/mL (Inóculo Final).

A solução estoque de cada óleo, *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus*, foi preparada a 29,6 mg/mL (3,29%) com Caldo Mueller Hinton (*E. coli*) ou MRS (*L. plantarum*) utilizando Tween 80 como emulsificante (3,29%). A partir da solução estoque foram feitas diluições duplas seriadas em uma faixa de 14,80 a 0,116 mg/mL ao longo do eixo Y da microplaca. Para isso, inicialmente foram colocados 180 µL de caldo Mueller Hinton ou MRS em todos os poços destinados a conter as

concentrações do óleo e seguidamente foram adicionados 180 µL da solução estoque só nos poços da primeira fila, a partir dos quais, foram realizadas as diluições duplas seriadas. Vinte microlitros do inóculo final foram adicionados aos poços que continham as concentrações do óleo, sendo o volume final de cada poço de 200 µL e a população bacteriana de $\sim 2 \times 10^4$ UFC/poço ($\sim 10^5$ UFC/mL). Foram utilizados um controle do meio de cultura (200 µL Caldo MH ou MRS), um controle de crescimento (180 µL de caldo + 20 µL do inóculo), um controle do emulsificante Tween 80 (200 µL de caldo com Tween 80 + 20 µL do inóculo) e um controle de crescimento no emulsificante (180 µL de caldo com Tween 80 + 20 µL do inóculo). Finalmente, as microplacas foram incubadas em um leitor de microplaca (Vitor™ X3, PerkinElmer) a 37 °C por 24 horas para *E. faecalis* e a 30 °C por 32 horas para *L. rhamnosus*. Durante a incubação, a cada hora foram realizadas leituras da absorbância a 600nm, com as quais foram construídas curvas de sobrevivência. A CIM foi estabelecida como a concentração mais reduzida do óleo essencial ou mistura que inibiu o crescimento bacteriano visível. Portanto, para a determinação da CIM foram avaliadas as curvas de sobrevivência e o resultado do teste de resazurina (0,0135% m/v). A resazurina foi utilizado como corante indicador do crescimento microbiano e para isso se acrescentou 25 µL/poço deste corante, sendo o crescimento bacteriano evidenciado pela mudança na cor azul da resazurina a rosa resofurina (PEREIRA et al., 2014). O teste foi realizado em triplicata.

4.2.3.2 Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A determinação da CBM foi realizada a partir dos poços onde não houveram crescimento bacteriano visível. Retirou-se uma alíquota de 100µL de cada poço e foram semeados na superfície do ágar Muller-Hinton ou MRS, dependendo da bactéria testada. Após o período de incubação, 18-20 h a 37°C para *E. faecalis* e 48 h a 30°C para o *L. rhamnosus*, foi definida a concentração bactericida mínima como a menor concentração do óleo essencial capaz de causar a morte total da bactéria representada pela ausência de colônias no ágar.

4.2.3.3 Determinação do índice da Concentração Inibitória Fracionada (CIF)

O efeito da combinação dos óleos essenciais de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* foi determinado pelo método de checkerboard em uma microplaca de 96 poços a partir das CIMs de cada óleo essencial determinados no item 4.2.3.1 para as bactérias estudadas. Para isso, ao longo do eixo X da microplaca foram colocados 90 µL do óleo essencial de *E. globulus* em uma faixa de concentração da $CIM_{E. globulus}$ até $1/8 \times CIM_{E. globulus}$. Na sequência, ao longo do eixo Y foram adicionados 90 µL do óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus* na faixa de concentração desde $2 \times CIM_{P. pseudocaryophyllus}$ até $1/32 \times CIM_{P. pseudocaryophyllus}$. Vinte microlitros do inóculo de cada bactéria padronizada a 1×10^6 UFC/mL foi adicionado a cada poço, sendo a suspensão bacteriana presente em cada poço de $\sim 2 \times 10^4$ UFC ou $\sim 10^5$ UFC/mL. Adicionalmente, um controle de crescimento bacteriano foi utilizado, sendo a microplaca arranjada como apresentado na Figura 4.1. A microplaca foi incubada a 37 °C por 24 horas para *E. faecalis* e a 30 °C por 48 horas para *L. rhamnosus*. Após a incubação 20 µL de resazurina foi adicionado a cada poço para avaliar o crescimento bacteriano. O teste foi realizado em triplicata. Os valores do CIFI foram determinados mediante a seguinte equação:

$$\text{índice CIF} = \sum CIF = CIF_{E. globulus} + CIF_{P. pseudo}$$

Onde:

$$CIF_{E. globulus} = \frac{CIM_{E. globulus} \text{ na mistura}}{CIM_{E. globulus} \text{ individualmente}}$$

e

$$CIF_{P. pseudo} = \frac{CIM_{P. pseudo} \text{ na mistura}}{CIM_{P. pseudo} \text{ individualmente}}$$

Os valores ΣCIF foram interpretados da seguinte forma: $\leq 0,5$ = sinergismo; $0,5 - 0,75$ = sinergismo parcial; $0,76$ a $1,0$ = efeito aditivo; $> 1,0 - 4,0$ = indiferente (não tem interação); $> 4,0$ = antagonismo (SADIKI et al., 2014).

Figura 4.1 - Arranjo da microplaca pelo método de checkerboard para avaliar o efeito antibacteriano da combinação dos óleos de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus*

4.2.3.4 Determinação do tempo de morte (Time-Kill assay)

O Time-Kill foi determinado utilizando a metodologia descrita por Carson et al. (2002) com algumas modificações. A atividade do óleo essencial com o melhor desempenho sobre *E. faecalis* e *L. plantarum* foi avaliada por medição da redução do número de UFC/mL pelo período de até 1h. Suspensões bacterianas foram padronizada a 10^6 UFC/mL como indicado no item 4.2.3.1. A solução de óleo essencial em caldo Mueller Hinton (*E. faecalis*) ou MRS (*L. rhamnosus*), na dose equivalente da CIM, foi preparada em tubos a um volume de 1,8 mL. A estes tubos 0,2 mL da suspensão bacteriana (10^5 UFC/mL) foi adicionado e incubado em banho de água quente a 37°C, no caso de *E. faecalis* e a 30°C, no caso do *L. rhamnosus* por 15 s, 30 s, 1 min, 3 min, 6 min, 12 min, 30 min e 1 h. Após o tempo de incubação os tubos foram retirados e centrifugados a 13.000 xg. por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pélete bacteriano ressuspensionado em 1,8 mL de solução salina de cloreto de sódio 0,85%. Diluições seriadas decimais em peptona bacteriológica foram realizadas tomando 1 mL da ressuspensão e 20 µL de cada diluição foi plaqueado pelo método da microgota em ágar Mueller Hinton ou MRS. Após a incubação das placas a 37°C por 24 h, para *E. faecalis* e 30°C por 48 h, para *L. rhamnosus*, foi

realizada a contagem das UFC/mL sobreviventes à ação do óleo essencial a cada intervalo de tempo. Curvas de sobrevivência (tempo de morte) foram plotadas.

4.2.3.5 Avaliação da tolerância bacteriana a doses sequenciais do óleo essencial.

Para tentar simular *in vitro* o que acontece com as bactérias no trato gastrointestinal dos animais, as bactérias foram submetidas sucessivamente, a cada três horas, à mesma dose do óleo essencial, uma vez que se o óleo essencial fosse adicionado na ração animal, toda vez que o animal fosse se alimentar, o organismo animal estaria ingerindo e expondo as bactérias do seu trato intestinal a uma nova dose do óleo essencial. Nesse sentido, pretendeu-se com esta avaliação submeter sucessivamente a *E. faecalis* e *L. rhamnosus* a uma dose inferior a CIM do óleo essencial de melhor desempenho, por exemplo a CIM/4, a cada três horas. Assim, preparou-se a solução de óleo essencial na concentração equivalente à CIM/4, com caldo Mueller Hinton ou MRS, dependendo da bactéria a ser avaliada. Quatro tubos testes foram preparados acrescentando-se 1,8 mL da solução de óleo e 0,2 mL do inóculo bacteriano contendo 10^6 UFC/mL, visando atingir no tubo teste uma população bacteriana inicial de 10^5 UFC/mL. Um primeiro tubo logo após a adição do inóculo e homogeneização foi centrifugado a 14.000 xg. por 10 minutos, o sobrenadante descartado e o pélete bacteriano ressuspensionado em 1,8 mL de solução de NaCl a 0,85%. Com 1 mL dessa resuspensão foram realizadas diluições seriadas decimais, em peptona bacteriológica, seguido do plaqueamento de 20 µL de cada diluição pelo método da microgota em ágar Mueller Hinton (*E. faecalis*) ou MRS (*L. rhamnosus*), para contagem das UFC sobreviventes. Um segundo tubo foi deixado incubado por 3 h a 37°C e após este tempo foi centrifugado e o pélete bacteriano ressuspensionado para contagem das UFC sobreviventes, conforme descrito. Um terceiro tubo foi deixado incubado por 3 h a 37°C e após este período centrifugado, o sobrenadante separado e ao pélete bacteriano adicionado uma nova alíquota de 1,8 mL de solução de óleo essencial. Este tubo foi deixado incubado por 3 h adicionais e ao final deste período foi centrifugado para isolamento do pélete bacteriano e contagem de UFC sobreviventes. Este tubo foi, portanto incubado por 6 horas no total, sendo o pélete bacteriano exposto a uma nova dose CIM/4 a cada três horas. Um quarto tubo foi manuseado como o terceiro tubo, mas ao final do segundo período de incubação ao

invés de seguir-se para a contagem bacteriana, foi adicionado uma nova alíquota de 1,8 mL de solução de óleo e incubado por mais 3 horas. Ao final deste período o tubo foi centrifugado, o pélete isolado e procedeu-se a contagem bacteriana. Este tubo foi portanto, incubado por 9 horas no total, sendo o pélete bacteriano exposto a uma nova dose CIM/4 a cada três horas. O mesmo procedimento acima foi realizado em tubos denominados testemunhas onde o pélete foi exposto periodicamente somente a uma nova solução do caldo sem conter o óleo essencial. A avaliação foi realizada em triplicata.

Visando comparar os resultados da exposição das bactérias a doses novas do óleo a cada três horas com a exposição única pelos mesmos períodos de incubação o mesmo protocolo acima foi seguido, contudo sem interromper os tempos de incubação a cada três horas. Assim, os tempos de incubação foram contínuos.

4.3 Resultados

4.3.1 CIM e CBM

Através dos valores das CIMs e CBMs foi avaliada a atividade antibacteriana individual dos óleos *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus*, sobre a bactéria patogênica modelo *E. faecalis* e a bactéria probiótica modelo *L. rhamnosus*. As CIMs e as CBMs são apresentadas na Tabela 4.1.

Tabela 4.1 – Atividade antibacteriana do óleo de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* sobre *E. faecalis* e *L. rhamnosus*

Espécie bacteriana	<i>Eucalyptus globulus</i>			<i>Pimenta pseudocaryophyllus</i>		
	CIM (mg/mL)		CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)		CBM (mg/mL)
	CS ¹	Rz ²		CS ¹	Rz ²	
<i>E. faecalis</i>	7,40	14,80	14,80	7,40	7,40	7,40
<i>L. rhamnosus</i>	14,80	14,80	> 14,80	3,70	3,70	14,80

¹ Curvas de sobrevivência

² Teste de resazurina

Observa-se que houve uma discordância na determinação da CIM do óleo de *E. globulus* para *E. faecalis* através dos dois métodos utilizados: o teste de resazurina e as curvas de sobrevivência. A CIM pelo teste de resazurina foi de 14,80 mg/mL (1,645% v/v) e a CIM mediante as curvas de sobrevivência (Fig. 4.2) foi de 7,40 mg/mL

(0,823%) para esta bactéria patogênica. Como relatado no Capítulo 3, para o estudo foi considerado a CIM determinada pelo teste de resazurina uma vez que, este método, identifica o crescimento microbiano através da leitura visual direta e é utilizado com maior frequência. Observa-se também que a CBM do óleo de *E. globulus* para o *E. faecalis* foi de 14,80 mg/mL.

Em relação ao *L. rhamnosus*, a CIM do óleo de *E. globulus* foi de 14, 80 mg/mL (1,645% v/v) por ambos os métodos utilizados para sua determinação (Tabela 4.1 e Fig. 4.3), e não foi observado uma concentração bactericida para esta bactéria probiótica com as concentrações deste óleo essencial avaliadas. Observa-se assim, que o óleo de *E. globulus* apresentou um efeito antibacteriano mais reduzido sobre a bactéria probiótica, já que foi observado que este óleo essencial foi bactericida para a bactéria patogênica *E. faecalis* na dose equivalente a CIM para o *L. rhamnosus*.

O óleo de *P. pseudocaryophyllus* mostrou a maior atividade antibacteriana sobre as duas bactérias, observando-se CIMs e CBMs mais reduzidas em comparação com o óleo de *E. globulus*. As CIMs foram de 7,40 mg/mL (0,823%) e 3,70 mg/mL (0,411%), para *E. faecalis* e *L. rhamnosus*, respectivamente (Tabela 4.1). Tanto as curvas de sobrevivência (Fig. 4.3 e 4.5) e o teste de resazurina coincidiram na determinação da CIM deste óleo essencial para ambas as bactérias. Observou-se que este óleo essencial foi bactericida para as duas bactérias, sendo as CBMs de 7,40 mg/mL (0,823%) e 14,80 mg/mL (1,645%), para *E. faecalis* e *L. rhamnosus*, respectivamente.

Analisando as curvas de sobrevivência do *E. faecalis*, nas Figuras 4.2 B e 4.4 B, correspondentes ao crescimento desta bactéria nas diversas concentrações do emulsificante Tween 80, foi observado que o Tween 80 exerceu um efeito antibacteriano na fase estacionária do crescimento do *E. faecalis*, sendo observado um decréscimo da população bacteriana nesta fase (linhas decrescentes) em todas as concentrações do emulsificante, com a exceção da mais baixa concentração (0,463 mg/mL), na qual, a partir das 20 h houve uma recuperação do crescimento do *E. faecalis*. O efeito do Tween 80 na fase estacionária também foi observado quando o *E. faecalis* foi submetido às diversas concentrações dos óleos essenciais. Porém, este efeito não interferiu na ação antibacteriana dos óleos de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus*, já que como manifestado no Capítulo 3 e ratificado neste Capítulo, a ação antibacteriana destes óleos essenciais foi observada no atrasando do início da fase exponencial e diminuindo a capacidade de reprodução da população bacteriana durante a fase exponencial (Fig. 4.2 C e 4.4 C).

Figura 4.2 – (A) Curva de crescimento normal do *E. faecalis*, (B) Curvas de crescimento do *E. faecalis* submetido a concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do *E. faecalis* a oito doses do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

Figura 4.3 – (A) Curva de crescimento normal do *L. rhamnosus*, (B) Curvas de crescimento do *L. rhamnosus* submetido a concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do *L. rhamnosus* a oito doses do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*

Figura 4.4 – (A) Curva de crescimento normal do *E. faecalis*, (B) Curvas de crescimento do *E. faecalis* submetido a concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do *E. faecalis* a oito doses do óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus*

Figura 4.5 – (A) Curva de crescimento normal do *L. rhamnosus*, (B) Curvas de crescimento do *L. rhamnosus* submetido a concentrações duplas seriadas do controle negativo (Tween 80), (C) Curvas de sobrevivência do *L. rhamnosus* a oito doses do óleo essencial de *P. pseudocaryophyllus*

Da mesma maneira, foi observado também que no caso do *L. rhamnosus*, o Tween 80, não mostrou nenhum efeito sobre o crescimento desta bactéria nas concentrações avaliadas (Fig. 4.3 B e 4.5 B).

Por outro lado, o óleo de *E. globulus*, em concentrações inferiores à CIM, continuou apresentando uma atividade antibacteriana seletiva, ou seja, maior atividade antibacteriana sobre o *E. faecalis* e menor atividade antibacteriana sobre o *L. rhamnosus* (Fig. 4.2 C e 4.3 C). Assim, à concentração de 3,70 mg/mL (CIM/4) produziu-se uma inibição do crescimento do *E. faecalis* até 8 horas, e uma redução da população bacteriana (curva com valores de absorbância menores do que os observados na curva da bactéria não exposta ao óleo). Nesta mesma concentração, o *L. rhamnosus* recuperou o seu crescimento normal e sua população (Fig. 4.3 C). Portanto, esta concentração poderia ser efetiva para produzir uma inibição da bactéria patogênica em um período menor do que 24 horas, e com uma menor inibição da bactéria probiótica.

Em relação ao óleo de *P. pseudocaryophyllus*, observou-se que o efeito inibitório deste óleo foi mais pronunciado sobre o *L. rhamnosus*, já que às quatro maiores concentrações resultou em uma fase de adaptação mais longa desta bactéria, em comparação com o *E. faecalis* (Fig. 4.4 C e 4.5 C).

4.3.2 Índice da Concentração Inibitória Fracionada (CIF)

O efeito antibacteriano da combinação dos óleos de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* foi determinado através do índice da Concentração Inibitória Fracionada (CIF). As combinações que continham as mínimas concentrações dos óleos essenciais, que produziram a inibição do *E. faecalis* e *L. rhamnosus* são apresentados na Tabela 4.2.

No caso do *E. faecalis*, foram observadas duas combinações inibitórias mínimas para esta bactéria: $1/8 \times \text{CIM } E. \text{ globulus} + \text{CIM } P. \text{ pseudocaryophyllus}$, e $\text{CIM } E. \text{ globulus} + 1/32 \times \text{CIM } P. \text{ pseudocaryophyllus}$, sendo os valores do índice CIF de 1,13 e 1,03, respectivamente. Estes valores indicaram um efeito inibitório indiferente das duas combinações, ou seja, não houve uma interação dos óleos de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* sobre a inibição do *E. faecalis*. Observa-se que cada combinação, esteve conformada pela CIM de um dos dois óleos, sendo portanto a inibição do *E.*

faecalis produzida só pela ação individual do óleo de *P. pseudocaryophyllus* no caso da primeira combinação e do óleo de *E. globulus* no caso da segunda combinação.

Tabela 4.2 – Índice da concentração inibitória fraccionada (CIF) das combinação do *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* sobre *E. faecalis* e *L. rhamnosus*

Bactéria	Combinação	Óleo essencial	CIM individual (mg/mL)	CIM Combinação (mg/mL)	CIF	Índice CIF	Interação
<i>E. faecalis</i>	1º	<i>E. globulus</i>	14,80	1,85	0,13	1,13	Indiferente
		<i>P. pseudocaryophyllus</i>	7,40	7,40	1,00		
	2º	<i>E. globulus</i>	14,80	14,80	1,00	1,03	Indiferente
		<i>P. pseudocaryophyllus</i>	7,40	0,231	0,03		
<i>L. rhamnosus</i>	1º	<i>E. globulus</i>	14,80	7,40	0,50	1,00	Aditivo
		<i>P. pseudocaryophyllus</i>	3,70	1,85	0,50		

Em relação ao *L. rhamnosus*, observou-se que a combinação inibitória mínima foi constituída por 1/2 x CIM de *E. globulus* + 1/2 x CIM de *P. pseudocaryophyllus* e o índice CIF foi igual a 1,00, indicando que esta combinação apresentou um efeito antibacteriano aditivo na inibição do *L. rhamnosus*. Portanto, que o efeito antibacteriano produzido pela interação de ambos óleo essenciais foi igual ao efeito antibacteriano individual do óleo de *E. globulus* ou *P. pseudocaryophyllus*.

4.3.3 Time kill

A análise de Time Kill foi realizada com o óleo essencial de *E. globulus*, já que individualmente, apresentou o melhor desempenho (atividade antibacteriana seletiva, com menor ação sobre a bactéria probiótica).

Na Figura 4.6 é representada a análise de Time Kill do *E. faecalis* e *L. rhamnosus* expostos à CIM (14,80 mg/mL) do óleo de *E. globulus*.

Observa-se que o óleo de *E. globulus* provocou uma redução rápida na viabilidade do *E. faecalis*. Somente o contato com o óleo, tempo zero, provocou uma redução da viabilidade de ~3 ciclos Log₁₀ (Inóculo inicial = 10⁵ UFC/mL) e inviabilidade total da população bacteriana foi atingida com 30 s de exposição a esta dose.

A exposição do *L. rhamnosus* a dose de 14,80 mg/mL do óleo de *E. globulus* provocou de imediato uma redução da viabilidade em ~3 ciclos Log₁₀, mas a exposição a tempos maiores não provocou reduções adicionais

Figura 4.6 – Análises de Time Kill (tempo de morte) do *E. faecalis* e *L. rhamnosus* à CIM (14,80 mg/mL) do óleo essencial de *E. globulus* (—●—); Controle de crescimento bacteriano (—●—)

4.3.4 Tolerância bacteriana a doses sequenciais do óleo essencial

A análise da tolerância do *E. faecalis* e *L. rhamnosus* a doses sequenciais do óleo de *E. globulus* à CIM/4 (Concentração efetiva observada nas curvas de sobrevivência que causo maior inibição da bactéria patogênica *E. faecalis* e menor inibição da bactéria probiótica *L. rhamnosus*) é apresentada na Figura 4.7.

Figura 4.7 – Tolerância do *E. faecalis* e *L. rhamnosus* a doses sequenciais (—●—) do óleo de *E. globulus*, em comparação à tolerância a uma única doses (---●---). Controle de crescimento bacteriano: doses sequenciais (—●—) e doses única (---●---)

A curva de sobrevivência do *E. faecalis* quando exposta a doses sequenciais de 3,7 mg/mL (CIM/4) do óleo de *E. globulus* mostra que já no contato imediato do óleo com a bactéria (tempo de exposição 0) o óleo foi capaz de provocar uma diminuição de ~1 ciclo Log₁₀ na viabilidade da bactéria em comparação ao controle. A incubação por 3 h por sua vez provocou uma redução adicional de mais ~1 ciclo Log₁₀ em relação a população inicial. A exposição uma ou duas vezes mais a novas doses de 3,7 mg/mL, fez com que a população bacteriana perdesse totalmente a viabilidade. Contudo, a curva de sobrevivência desta bactéria, quando exposta uma única vez a dose de 3,7 mg/mL, provocou uma redução semelhante à exposição sequencial, no tempo zero e com três horas de incubação, mas com 6 e 9 horas de incubação não foi observado uma redução adicional como na exposição sequencial.

A exposição uma única vez ou sequencial do *L. rhamnosus* a uma dose de 3,7 mg/mL do óleo de *E. globulus* provocou um mesmo comportamento da população desta bactéria em todos os tempos de incubação. Inicialmente, houve uma redução imediata (tempo zero) de aproximadamente ~1 ciclo Log₁₀ na viabilidade da população desta bactéria em comparação ao controle, e no período total de 9 horas uma redução de ~1 ciclo Log₁₀ adicional foi observado.

Assim, pôde se observar que a exposição única ou sequencial a uma mesma dose produziu efeitos diferentes sobre a população de *E. faecalis* e *L. rhamnosus*. A bactéria *E. faecalis* foi mais susceptível a doses sequenciais que a uma dose única, enquanto o *L. rhamnosus* apresentou a mesma susceptibilidade em dose única ou sequencial. Este comportamento permite supor que a adição do óleo na ração tem o potencial de diminuir a população patogênica e não afetar expressivamente a população probiótica.

4.4 Discussão

Os resultados mostraram que um melhor efeito antibacteriano foi apresentado quando os óleos essenciais de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus* atuaram individualmente do que em combinação, já que não conseguiu-se alcançar um efeito sinérgico na inibição da bactéria patogênica *E. faecalis*. Além disso, um efeito aditivo foi alcançado para a bactéria probiótica *L. rhamnosus*, indicando que a combinação de ambos óleos essenciais foi mais prejudicial para esta bactéria. Quando os óleos

essenciais são combinados, a interação de seus compostos podem produzir diferentes efeitos: indiferença, aditividade, antagonismo ou sinergismo. Um efeito aditivo é observado quando o efeito combinado é igual à soma dos efeitos individuais, antagonismo é quando o efeito de um ou ambos compostos é menor quando eles são aplicados em conjunto do que quando são aplicados individualmente, sinergismo é quando o efeito dos compostos combinados é maior do que a soma dos efeitos individuais e indiferença é observada quando há ausência de interação dos compostos (BASSOLÉ; JULIANI, 2012). Na literatura existem poucos estudos referentes à avaliação do efeito antibacteriano combinado de óleos essenciais sobre *E. faecalis*, e são inexistentes os reportes neste aspecto sobre bactérias probióticas como *L. rhamnosus*. No estudo realizado por Bassolé et al. (2010), a combinação dos óleos de *Lippia multiflora* + *Mentha piperita*, *L. multiflora* + *Ocimum basilicum*, e *M. piperita* + *O. basilicum* mostraram resultados favoráveis na inibição do *E. faecalis*, sendo o efeito antibacteriano alcançado pela combinação desses óleos essenciais sinérgico, com CIF iguais a 0,11; 0,44 e 0,37; respectivamente. De forma similar, a combinação de compostos isolados de óleos essenciais como Carvacrol + p-cimeno, linalool + α -terpineol, e α -terpineno + γ -terpineno mostraram também ter efeitos sinérgicos na inibição do *E. faecalis*, alcançando índices CIF de 0,508; 0,281 e 0,250, respectivamente (AHMAD et al., 2014). Além disso, um efeito aditivo foi reportado para *E. faecalis* na combinação dos óleos de *Cinnamon zeylanicum* e *Syzygium aromaticum* (GOÑI et al., 2009). Portanto, esses estudos mostraram efeitos positivos da combinação de óleos essenciais, os quais, não foram alcançados em nosso estudo para a combinação dos óleos de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus*, indicando que não se produziu uma interação entre os compostos desses dois óleos quando eles foram combinados para tentar potencializar sua atividade antibacteriana individual na inibição da bactéria patogênica *E. faecalis*, já que um efeito antibacteriano indiferente foi observado.

Por outro lado, o óleo de *E. globulus* individualmente foi o óleo que apresentou o melhor desempenho, pois resultados interessantes foram obtidos para este óleo, já que mostrou ter uma atividade antibacteriana seletiva, menor ação sobre a bactéria probiótica *L. rhamnosus* e maior ação sobre a bactéria patogênica *E. faecalis*, sendo observada não só na determinação da CIM e CBM, mas também na análise de Time Kill e na tolerância bacteriana a doses sequenciais deste óleo essencial. A atividade na inibição de *E. faecalis* por parte do óleo de *E. globulus* tem sido já relatada em

alguns estudos. Assim, foi observada a inibição de um clone de *E. faecalis* resistente ao antibiótico Vancomicina, à concentração de 1 mg/mL deste óleo e um efeito bactericida na concentração de 2 mg/mL (MULYANINGSIH et al., 2010; MULYANINGSIH et al., 2011). Uma concentração inibitória mínima (CIM) mais alta foi observada com uma amostra comercial do óleo de *E. globulus*, sendo ela 5,86% v/v (MAYAUD et al., 2008). As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais podem ser resultado de uma sinergia de todos os compostos contidos neles ou pode ser resultado apenas dos principais compostos presentes (BAKKALI et al., 2008). Como mostrado no Capítulo 3, o óleo de *E. globulus* foi caracterizado por ter como composto majoritário ao 1,8 cineol (Eucaliptol), ao qual, geralmente é atribuído as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais que o contém. O 1,8 cineol isoladamente tem sido avaliado quanto a sua capacidade antimicrobiana sobre diversas bactérias, demonstrando inibir bactérias, tais como *E. coli*, *B. cereus*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*, *M. catarrhalis* e *C. neoformans* em concentrações ≤ 16 mg/mL. No caso de *E. faecalis*, uma menor atividade foi observada pois a CIM para esta bactéria foi mais alta, 23 mg/mL (VAN VUUREN E VILJOEN, 2007). Contudo, outro estudo mostrou que o 1,8 cineol não foi efetivo na inibição de *E. coli*, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* clones e clones resistente a Vancomicina (VRE) de *E. faecalis* (MULYANINGSIH et al., 2010).

É possível que a atividade biológica do composto principal dos óleos essenciais seja modulado pelos compostos minoritários, pois muitos deles são responsáveis pela definição das diversas características dos óleos essenciais, tais como a atração lipofílica e hidrofílica, capacidade de fixação na parede celular e membranas, penetração celular e distribuição dos óleos essenciais dentro da célula do micro-organismo. Devido a isso, para fins biológicos, como a atividade antibacteriana dos óleos essenciais, é mais importante o estudo do óleo essencial integral, ao contrário do estudo em algum de seus compostos, já que efeitos sinérgicos entre os compostos do óleo essencial podem ser mais significativos em relação a sua atividade antibacteriana (BAKKALI et al., 2008). Por exemplo, a combinação de limoneno e 1,8 cineole, dois compostos identificados no óleo de *E. globulus* no Capítulo 3 de nosso estudo, segundo van Vuuren e Viljoen (2007) produziram a inibição de *E. faecalis* a 8 e 16 mg/mL (dependendo do enantiômero (-) ou (+) de limoneno), sendo estas doses mais baixas do que as observadas pelos autores para 1,8 cineol (23 mg/mL) e limoneno isoladamente (27mg/mL). Portanto, uma maior atividade foi observada

quando ambos compostos atuaram combinados do que individualmente, sendo possível que a interação desses compostos dentro do óleo de *E. globulus* tenha responsabilidade na atividade antibacteriana deste óleo essencial.

Os nossos resultados também mostraram que óleo de *E. globulus* apresentou uma atividade seletiva inclusive em concentrações inferiores à CIM deste óleo, ou seja, na dose de 3,70 mg/mL (CIM/4). Nesta dose este óleo apresentou na exposição sequencial a capacidade de inviabilizar a população da bactéria patogênica e somente inibir ligeiramente a bactéria probiótica. Este comportamento sugere que a adição deste óleo, nesta dose, a rações de animais possa proporcionar um controle de bactérias patogênicas sem afetar expressivamente as bactérias probióticas. Pois, o mesmo efeito observado na avaliação da exposição sequencial realizada neste estudo, poderia ocorrer nos animais ingerindo a ração com o óleo, uma vez que os animais poderiam cada vez que se alimentassem da ração, estar expondo as bactérias patogênicas do seu trato gastrointestinal a doses sequenciais do óleo.

4.5 Conclusão

O estudo mostrou que uma melhor atividade antibacteriana foi apresentada pela ação individual dos óleos essenciais do que de sua combinação. O óleo de *E. globulus* mostrou um melhor desempenho do que o óleo de *P. pseudocaryophyllus*, sendo sua atividade antibacteriana seletiva, com uma menor ação sobre a bactéria probiótica *L. rhamnosus*. Além disso, a análise de Time Kill mostrou o tempo no qual o óleo de *E. globulus* causou a inviabilização total da bactéria patogênica *E. faecalis* à CBM. Um resultado interessante foi observado a uma concentração inferior à CIM deste óleo, sendo que a aplicação de doses sequenciais da CIM/4 (3,70 mg/mL), foi capaz de provocar a inviabilização total (bactericida) da bactéria patogênica e somente inibir parcialmente à bactéria probiótica *L. rhamnosus*, tendo o óleo de *E. globulus* um efeito antibacteriano seletivo inclusive a esta concentração. Portanto, por seu potencial antibacteriano seletivo, o óleo de *E. globulus* poderia ser sugerido como alternativa aos antibióticos convencionais usados na alimentação animal. No entanto, estudos *in vivo* são necessários para confirmar a efetividade deste óleo.

Referencias

AHMAD, A.; VAN VUUREN, S.; VILJOEN, A. Unravelling the complex antimicrobial interactions of essential oils—the case of *Thymus vulgaris* (Thyme). **Molecules**, Basel, v. 19, n. 3, p. 2896-2910, 2014.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.

BASSOLÉ, I.H.N.; JULIANI, H.R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, Basel, v. 17, n. 4, p. 3989-4006, 2012.

BASSOLÉ, I.H.N.; LAMIEN-MEDA, A.; BAYALA, B.; TIROGO, S.; FRANZ, C.; NOVAK, J.; NEBIÉ, R.C.; DICKO, M.H. Composition and antimicrobial activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. essential oils and their major monoterpene alcohols alone and in combination. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 11, p. 7825-7839, 2010.

BONAPACE, C.R.; BOSSO, J.A.; FRIEDRICH, L.V.; WHITE, R.L. Comparison of methods of interpretation of checkerboard synergy testing. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, New York, v. 44, n. 4, p. 363-366, 2002.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE-CLSI. **Methods for Antimicrobial Dilution and Disk Susceptibility Testing of Infrequently Isolated or Fastidious Bacteria; Proposed Guideline**. CLSI document M45-P, 2010.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE-CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard. 9th ed. CLSI document M07-A9, 2012.

DIAZ-SANCHEZ, S.; D'SOUZA, D.; BISWAS, D.; HANNING, I. Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. **Poultry Science**, Champaign-Illinois, v. 94, n. 6, p. 1419-1430, 2015.

DOS SANTOS, B.C.; DA SILVA, J.C.T.; GUERRERO, P.G.; LEITÃO, G.G.; BARATA, L.E. Isolation of chavibetol from essential oil of *Pimenta pseudocaryophyllus* leaf by high-speed counter-current chromatography. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1216, n. 19, p. 4303-4306, 2009.

DIBNER, J.J.; RICHARDS, J.D. Antibiotic growth promoters in agriculture: history and mode of action. **Poultry Science**, Champaign-Illinois, v. 84, n. 4, p. 634-643, 2005.

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, London, v. 116, n. 4, p. 982-989, 2009.

GUARDABASSI, L.; KRUSE, H. Principles of prudent and rational use of antimicrobials in animals. In: GUARDABASSI, L.; JENSEN, L.B.; KRUSE, H. (Ed.). **Guide to Antimicrobial Use in Animals**. Oxford: Wiley-Blackwell Publishing., 2008. chap. 1, p. 1-12.

MAYAUD, L.; CARRICAJÓ, A.; ZHIRI, A.; AUBERT, G. Comparison of bacteriostatic and bactericidal activity of 13 essential oils against strains with varying sensitivity to antibiotics. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 47, n. 3, p. 167-173, 2008.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; REICHLING, J.; WINK, M. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 49, n. 9, p. 893-899, 2011.

MULYANINGSIH, S.; SPORER, F.; ZIMMERMANN, S.; REICHLING, J.; WINK, M. Synergistic properties of the terpenoids aromadendrene and 1,8 cineole from the essential oil of *Eucalyptus globulus* against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant pathogens. **Phytomedicine**, Jena, v. 17, n. 13, p. 1061-1066, 2010.

PAULA, J.A.M.D.; SILVA, M.D.R.R.; COSTA, M.P.; DINIZ, D.G.A.; SÁ, F.A.; ALVES, S.F.; LINO, R.C.; PAULA, J.R.D. Phytochemical analysis and antimicrobial, antinociceptive, and anti-inflammatory activities of two chemotypes of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Myrtaceae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2012, p. 420715, 2012.

SADIKI, M.; BALOUIRI, M.; BARKAI, H.; MAATAOUI, H.; KORAICHI, S.I.; ELABED, S. Synergistic antibacterial effect of *Myrtus communis* and *Thymus vulgaris* essential oils fractional inhibitory concentration index. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Madhya Pradesh, v. 6, p.121-124, 2014.

VAN VUUREN, S.F.; VILJOEN, A.M. Antimicrobial activity of limonene enantiomers and 1, 8-cineole alone and in combination. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 22, n. 6, p. 540-544, 2007.

5. CONCLUSÕES GERAIS

O presente trabalho avaliou o potencial antibacteriano de óleos essenciais sobre bactérias de ocorrência na microbiota patogênica e probiótica do trato gastrointestinal de animais de cria intensiva, especialmente suínos e aves, com a finalidade de proporcionar uma possível alternativa para substituir os antibióticos convencionais utilizados na alimentação animal atualmente.

Ao longo dos capítulos da dissertação os seguintes pontos foram avaliados:

- ✓ A ação antibacteriana seletiva dos óleos essenciais sobre a microbiota patogênica e probiótica, como uma característica fundamental do bom desempenho antibacteriano dos óleos essenciais. Assim, considerou-se óleos essenciais com atividade antibacteriana seletiva, aqueles que apresentaram uma maior ação antibacteriana sobre a microbiota patogênica e menor ação antibacteriana sobre a microbiota probiótica.

e

- ✓ O efeito antimicrobiano da combinação dos óleos essenciais.

Nesse sentido, no Capítulo 2, através de uma triagem da atividade antibacteriana de 28 óleos essenciais diferentes, foi observado que os óleos de *E. globulus*, *E. exserta*, *P. pseudocaryophyllus*, Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpens (estes dois últimos subprodutos do processamento da laranja para obtenção de suco) apresentaram uma atividade antibacteriana seletiva. Uma avaliação individual e combinada (em misturas binárias) destes cinco óleos essenciais, mostrou que uma melhor atividade antibacteriana seletiva foi obtida com os óleos atuando individualmente e não em combinação. Assim, o óleo Orange Oil Phase Essence e Citrus Terpens destacaram-se por ter a melhor atividade antibacteriana seletiva, sendo possível sugerir o aproveitamento destes subprodutos como potenciais antimicrobianos na alimentação animal.

No Capítulo 3, Orange Oil Phase Essence e a mistura binária *E. globulus*/*P. pseudocacryophyllus* (selecionada com base nos resultados do Capítulo 2 e da disponibilidade de óleos essenciais em nosso estoque) foram estudadas para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), na inibição de uma bactéria patogênica modelo *E. faecalis* e uma bactéria probiótica modelo *L. rhamnosus*. Os resultados mostraram que se avaliando estes dois parâmetros, o Orange Oil Phase Essence e a mistura apresentaram uma atividade antibacteriana seletiva, sendo ambos mais prejudiciais para o *L. rhamnosus*, uma vez que valores de CIM e CBM mais reduzidos foram observados para esta bactéria em comparação aos observados para bactéria patogênica. Porém, a construção de curvas de sobrevivência das bactérias, permitiu observar que o óleo Orange Oil Phase Essence, na dose de 3,70 mg/mL mostrava uma atividade seletiva atuando menos sobre a bactéria probiótica.

Na avaliação individual dos óleos essenciais de *E. globulus* e *P. pseudocaryophyllus*, para determinação da CIM e CBM e combinados em diferentes proporções, para cálculo do índice da Concentração Inibitória Fracionada (CIF), no Capítulo 4, foi possível observar que o óleo de *E. globulus* individualmente teve um efeito antibacteriano seletivo, mas em combinação com o óleo de *P. pseudocaryophyllus* não, indicando que a combinação de ambos óleos essenciais não potencializou as atividades antibacterianas observadas individualmente. Inclusive a uma concentração inferior da CIM, 3,70 mg/mL (CIM/4), o óleo de *E. globulus* continuou apresentando seletividade, já que a aplicação sequencial desta concentração foi mais prejudicial para a bactéria patogênica *E. faecalis*, causando a inviabilidade total da população desta bactéria, enquanto afetou ligeiramente a população da bactéria probiótica. Portanto, destaca-se o potencial antibacteriano seletivo do óleo de *E. globulus* para seu aproveitamento como uma alternativa aos antibióticos sintéticos.

Por outro lado, uma importante observação foi realizada nos Capítulos 3 e 4. A construção de curvas de crescimento do *E. faecalis* e *L. rhamnosus* submetidas a uma faixa de concentração do emulsificante Tween 80, utilizado para melhorar a dispersão dos óleos essenciais nos meios de cultura, permitiram visualizar que este emulsificante exerceu um efeito antibacteriano na fase estacionária de crescimento

do *E. faecalis*. Esta observação foi muito relevante, uma vez que em muitos estudos de avaliação das propriedades antibacterianas dos óleos essenciais o efeito do emulsificante sobre as bactérias não é avaliado. Não obstante, foi observado que este efeito não interferiu na mensuração da atividade antibacteriana dos óleos essenciais, já que a sua atividade foi na fase exponencial do crescimento desta bactéria.

Como conclusão geral, o estudo permitiu identificar óleos essenciais com um potencial antibacteriano seletivo *in vitro* entre bactérias patogênicas e probióticas, permitindo sugerir estes como possíveis antimicrobianos para substituir os antibióticos utilizados na alimentação de animais.

6. SUGESTÕES PARA PESQUISAS FUTURAS

Os resultados obtidos na presente dissertação são promissores em relação à atividade antibacteriana seletiva dos óleos essenciais, sendo uma alternativa botânica natural aos antimicrobianos sintéticos utilizados na alimentação de animais de criação intensiva destinados à produção de alimentos de origem animal, e assim poder combater o problema de resistência bacteriana aos antibióticos atualmente utilizados. Nesse sentido, para futuras pesquisas é importante a realização de estudos *in vivo* para confirmar o efetivo potencial antibacteriano, assim como a inocuidade dos óleos essenciais. Para isso, é indispensável o estudo e aplicação de tecnologias que permitam conservar a integridade dos óleos essenciais como técnicas de encapsulamento, já que a extrema volatilidade dos óleos essenciais dificultaria sua aplicação *in vivo* além de perder suas propriedades biológicas.