

**INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE**  
**Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação**  
**Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal**



**Dissertação**

**Bioprospecção antimicrobiana e citotóxica do óleo essencial de *Thymus vulgaris* e timol contra *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg isolada de frango de corte**

**Jhônatan Sperandio**

**Concórdia, 2020**

**Jhônatan Sperandio**

**Bioprospecção antimicrobiana e citotóxica do óleo essencial de *Thymus vulgaris* e timol contra *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg isolada de frango de corte**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

**Orientador:** Alessandra Farias Millezi

**Coorientadores:** Shirley Kuhnen

Ana Paula Almeida Bastos

**Concórdia, 2020**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e  
adaptado pela CTI - Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

S Sperandio, Jhônatan  
Bioprospecção antimicrobiana e citotóxica do óleo  
essencial de *Thymus vulgaris* e timol contra  
*Salmonella enterica* sorovar Heidelberg isolada de  
frango de corte / Jhônatan Sperandio; orientadora  
Alessandra Farias Millezi; coorientadora Shirley  
Kuhnen; coorientadora Ana Paula Bastos. -- Concórdia,  
2020.  
42 p.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal  
Catarinense, campus Concórdia, Programa de Pós-graduação  
em Produção e Sanidade Animal, Concórdia, 2020.

Inclui referências.

1. atividade antibacteriana. 2. tomilho. 3.  
Salmonelose. 4. sanitizante. I. Farias Millezi,  
Alessandra , II. Kuhnen, Shirley. III. Bastos, Ana  
Paula. IV. Instituto Federal Catarinense. Programa de  
Pós-graduação em Produção e Sanidade Animal. V. Título.

**JHÔNATAN SPERANDIO**

**BIOPROSPECÇÃO ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE  
*THYMUS VULGARIS* E TIMOL CONTRA *SALMONELLA ENTERICA* SOROVAR  
HEIDELBERG ISOLADA DE FRANGO DE CORTE.**

Trabalho de Conclusão aprovado como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, no Curso de Mestrado Profissional em Produção e Sanidade Animal, do Instituto Federal Catarinense.

Araquari/SC, 06 de agosto de 2020.

**Autenticação eletrônica na Folha de Assinaturas**

---

Prof. Dr.<sup>a</sup> Alessandra Farias Millezi  
Orientadora – IFC *Campus* Concórdia

**BANCA EXAMINADORA:**

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Shirley Kuhnen

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Almeida Bastos



---

*Emitido em 06/08/2020*

**DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS - CAMPUS ARAQUARI Nº 14/2020 - DEPE/ARA (11.01.02.02.02)**  
**(Nº do Documento: 4)**

**(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)**

*(Assinado digitalmente em 05/10/2020 17:13 )*

ALESSANDRA FARIAS MILLEZI  
PROFESSOR ENS BASICO TECN TECNOLOGICO  
CCTA/CON (11.01.04.09)  
Matricula: 1989957

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sig.ifc.edu.br/documentos/> informando seu número: **4**,  
ano: **2020**, tipo: **DOCUMENTOS COMPROBATÓRIOS - CAMPUS ARAQUARI**, data de emissão: **05/10/2020**  
e o código de verificação: **d18a714bf0**

## **Agradecimentos**

Agradeço a minha família por todo o suporte fornecido.

Agradeço a minha orientadora Dr.<sup>a</sup> Alessandra Farias Millezi que tive o imenso prazer de trabalhar durante mais uma etapa importante de vida. Agradeço por todo apoio fornecido, todo o conhecimento transmitido e pela compreensão nestes dois anos de trabalho árduo e intenso que compartilhamos juntos. Obrigado por me aceitar como orientado!

Agradeço a Dr. Shirley Kuhnen que sempre esteve comigo (desde a graduação) e sempre me incentivou e inspirou a gostar do mundo científico. Nunca mediu esforços em ajudar com análises, metodologias e discussões, auxílio fundamental para a execução deste trabalho.

À Dr. Ana Paula Almeida Bastos e toda a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, que muito me ajudaram nas análises e metodologias.

Agradeço a todos os membros do Laboratório de Biologia, do Instituto Federal Catarinense, principalmente Thais Dal Bello que muito me ajudou, realmente, a fazer as análises. Sou muito grato por toda tua ajuda e todo seu tempo dedicado a este trabalho, você é incrível!!

A empresa Seara Alimentos por ter cedido as bactérias utilizadas nesse trabalho, ao Daniel Fernando Rodigheri por apoiar desde o início minha decisão de fazer o mestrado, João Zuffo, Alesseandra Appel e Márcia Tonetto. Vocês são inspiração!

Aos meus amigos de vida, Myriam Granemann e Elaine Valeretto, foi graças ao apoio de vocês que cheguei até aqui.

Aos colegas de aula, Maiara Mattei, Gabi e Talita, obrigado por compartilhar todo o estresse, angústia e felicidade durante essa etapa difícil, mas gratificante, que resolvemos nos meter.

Aos meus colegas da BRF S.A., Leticia de Toni, Erich Kroetz, Maria Goretti Buzanello e Moises Stocco por todo o apoio necessário para finalizar essa etapa

Agradeço a todos que de forma indireta ou direta contribuíram para a realização deste trabalho.

## Resumo

SPERANDIO, Jhônatan. **Bioprospecção antimicrobiana e citotóxica do óleo essencial de *Thymus vulgaris* e timol contra *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg isolada de frango de corte.** 2020. 42f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2020.

*Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH) frequentemente é isolada em coletas de amostras de frango de corte a campo, sua elevada resistência ao ambiente é um fator que traz prejuízos a toda cadeia produtiva. Mesmo com a intensificação de procedimentos de biossegurança nas granjas, há pressão por parte da indústria para a eliminação deste patógeno. Comercialmente há diversos produtos, a base de amoníacos, utilizados para a limpeza e desinfecção do galpão, contudo, são de alta toxicidade tanto para o ambiente e animais quanto também para as pessoas que aplicam. A busca por agentes desinfetantes alternativos aos usuais faz com que diversos estudos avaliem a ação de óleos essenciais (OEs) frente a distintas bactérias. Por conta disto, o objetivo deste trabalho foi avaliar, *in vitro*, o efeito do OE de *Thymus vulgaris* (OET) e timol em SH isoladas de frango de corte, visando seu uso como agente antimicrobiano aditivo para rações. De acordo com as análises cromatográficas, os componentes majoritários OET foram: timol (47,3%), p-cinemo (26,8%) e linalol (5,2%). Para os ensaios antibacterianos *in vitro* foi utilizada a técnica de quantificação de células planctônicas viáveis em ensaios de microdiluição em caldo. Foram utilizadas quatro diferentes concentrações de OET (0,1%, 0,2%, 0,4% e 0,8%, v/v) contra cinco isolados de SH de frango de corte e ATCC 8326. Além disto, foi avaliada também a atividade do monoterpeneo timol nas concentrações de 0,023%, 0,047%, 0,071% e 0,094% (v/v). Para a avaliação da citotoxicidade, foi utilizada a técnica de MTT em células intestinais IEC-6 e fibroblastos NCTC em concentrações de 0,0625%, 0,125%, 0,25% e 0,5% de OET e timol, em 24h, para a avaliação do IC<sub>50</sub>. A partir da concentração de 0,2% de OET houve atividade bactericida, uma vez que não ocorreu crescimento de unidades formadoras de colônias em todas as bactérias testadas. Já o timol na concentração de 0,094% controlou 83,33% das bactérias, sendo menos eficaz que o óleo. O OET apresentou IC<sub>50</sub> de 0,14% e 1,22% enquanto para timol o IC<sub>50</sub> foi de 0,068% e 0,001%, para as células IEC-6 e NCTC, respectivamente. Concluiu-se que ambos compostos testados apresentaram certa citotoxicidade *in vitro* em células intestinais, limitando seu uso como aditivo para rações. Além disso, o timol sozinho não foi capaz de controlar os isolados estudados e teve uma citotoxicidade *in vitro* maior quando comparado ao OE. Por outro lado, o OET apresentou baixa citotoxicidade em fibroblastos e demonstrou potencial capacidade de ação para eliminação *in vitro* de cepas de SH na concentração de 0,2%, sugerindo a possibilidade de utilização deste composto na sanitização de estruturas dos aviários contaminados com este sorovar.

**Palavras Chaves:** atividade antibacteriana; tomilho; Salmonelose; sanitizante

## Abstract

SPERANDIO, Jhônatan. ***Thymus vulgaris* essential oil and thymol antibacterial activity against *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from broiler chicken**. 2020. 42f. Dissertação - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2020.

*Salmonella enterica* serovar Heidelberg (SH) is often isolated from samples in broiler chickens' farms. Its environmental resistance is a factor that harms the entire meat production chain. Although there is a higher intensification in farms biosecurity procedures, the pressure from the industry to eliminate this pathogen is increasing once salmonellosis can be a problem to the costumers. There are several products with ammonia in its composition that are used for the disinfection of poultry shed structures. These products usually have high toxicity to the environment, the animals, and people who manipulate it. On the other hand, research on essential oils (EO) and its bacterial activity has been increasing through the years. The objective of this study was to evaluate the in vitro effects of *Thymus vulgaris* essential oil (TEO), popularly known as thyme, on *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg. Qualitative analysis of the oil revealed thymol (47,3%), p-Cimene (26.8%) and linalool (5.2%) as major compounds. Viable plankton cell quantification technique was used for in vitro antibacterial assays. Four different concentrations of TEO (0.1%, 0.2%, 0.4% and 0.8%) were tested in 5 strains of SH isolated from broiler chickens' farms plus ATCC 8623. In addition, the activity of the monoterpene thymol at concentrations of 0.023%, 0.047%, 0.071% and 0.094% was also evaluated. For the cytotoxicity assay, MTT technique was used in IEC-6 intestinal cells and NCTC fibroblasts in concentrations of 0.0625%, 0.125%, 0.25% and 0.5% of TEO and thymol, in 24h, to find the IC<sub>50</sub>. Antibacterial activity was found from 0.2% of TEO in all SH strains tested. Thymol at 0.094% controlled 83.33% of the strains, not being as effective as TEO. TEO cytotoxicity assay showed IC<sub>50</sub> of 0.14% and 1.22% while thymol presented IC<sub>50</sub> of 0.068% and 0.001% for cells IEC-6 and NCTC, respectively. The monoterpene had higher cytotoxicity and did not control all strains of SH. Moreover, TEO presented low cytotoxicity in fibroblasts and demonstrated potential antibacterial activity 0.2%. These results suggest the possible use of TEO as a substitute for commercial products used for the disinfection of poultry sheds that were challenged by these bacteria.

**Keywords:** antibacterial activity; thyme; salmonellosis; sanitizer



## Lista de Figuras

Figura 1	Esquema de montagem da placa de 96 poços para testes de atividade citotóxica.....	17
Figura 2	Crescimento de UFCs sob tratamentos em diferentes concentrações de OET.....	19
Figura 3	Crescimento de UFCs sob tratamentos em diferentes concentrações de timol.....	20
Figura 4	Viabilidade das células IEC-6 após exposição ao OET e timol nas concentrações de 0,5%, 0,25%, 0,125% e 0,0625% em 24 h.....	21
Figura 5	Viabilidade das células Fibroblastos-NCTC ao OET e timol nas concentrações de 0,5%, 0,25%, 0,125% e 0,0625% em 24 h.....	22

## Lista de Tabelas

Tabela 1	Composição química do OET.....	14
----------	--------------------------------	----

### Lista de Abreviaturas e Siglas

ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ATCC	American Type Culture Collection
BHI	Brain Heart Infusion
BOD	Biochemical Oxygen Demand
CIM	Concentração inibitória mínima
CO <sub>2</sub>	Dióxido de carbono
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EPAGRI	Empresa de Pesquisa Agropecuária e Extensão Rural de Santa Catarina
h	Horas
IC <sub>50</sub>	Half maximal inhibitory concentration
IEC	Intestinal Epithelial Cell
mg	Miligrama
mL	Mililitro
MTT	3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio
nm	Nanometro
°C	Graus Celsius
rpm	Rotações por minuto
RPMI	Roswell Park Memorial Institute broth
SH	<i>Salmonella</i> Heidelberg
OET	Tomilho Essential Oil
TSA	Trypticase Soy Agar
TSB	Tryptone Soy Broth
OEs	Óleos essenciais
UFC	Unidade Formadora de colônia
µL	Microlitro
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais

## SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE.....	1
2	OBJETIVOS .....	6
2.1	Geral.....	6
2.2	Específicos.....	6
3	REFERÊNCIAS .....	7
4	Bioprospecção antimicrobiana e citotóxica do óleo essencial de <i>Thymus vulgaris</i> e timol contra <i>Salmonella enterica</i> sorovar Heidelberg isolada de frango de corte .....	11
4.1	Introdução.....	11
4.2	Material e Métodos .....	13
4.2.1	Local de condução dos experimentos: coleta, PCR, análises microbiológicas, citotoxicidade.....	13
4.2.2	Óleo essencial (OE) e timol .....	13
4.2.3	Emulsão a base de OET e timol .....	14
4.2.4	Obtenção, identificação e manutenção de cepas bacterianas .....	14
4.2.5	Avaliação da atividade antimicrobiana mediante quantificação de UFCs	15
4.2.6	Cultivo celular.....	15
4.2.7	Avaliação da citotoxicidade pelo método de MTT.....	17
4.2.8	Análise estatística.....	18
4.3	Resultados.....	18
4.4	Discussão.....	22
4.5	Conclusão.....	25
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	25
6	REFERÊNCIAS .....	27

## 1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

O Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango, com mais de 13 milhões de toneladas produzidas em 2019, atrás dos Estados Unidos e China (ABPA, 2020). De toda essa produção, 31,8% é destinada à exportação, fazendo com que o Brasil seja o maior exportador de carne de frango do mundo. Grande parte do destino deste alimento é para países do Oriente médio e da Ásia, tais como Arábia Saudita, Iraque, China e Japão. Em Santa Catarina, o setor possui cerca de 8.500 produtores, de acordo com o boletim agropecuário da Epagri de 2017, sendo responsável por cerca de 15% do abate de frangos de todo o Brasil, isto coloca Santa Catarina como o 2º maior produtor de carne de frango do País. Tais dados demonstram a importância da avicultura para o Estado.

Contudo, a exigência de mercados externos quanto à qualidade do produto vem crescendo, já que 67% de toda a exportação é de apenas cortes de frango (ABPA, 2019). Produtos contaminados com *Salmonella spp.*, por exemplo, possuem entrada barrada em diversos países, uma vez que a salmonelose é uma das mais importantes zoonoses no mundo (BELL & KYRIAKIDES, 2002). Com isso, órgãos federais têm buscado diminuir a incidência destas bactérias nas granjas. Tal fato fez com que, em 2016, fosse criada a Instrução normativa nº 20, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Desenvolvimento (BRASIL, 2016), a qual reforça o controle e o monitoramento de *Salmonella spp.* em planteis avícolas comerciais de frangos de corte e nos estabelecimentos de abate. Essa instrução cria, por exemplo, um regimento sobre as coletas de propé pré-abate para detecção de salmonela causadora de zoonoses e exige que um médico veterinário, a cada 6 meses, faça uma visita à propriedade para analisar o status sanitário da granja.

A *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, é um micro-organismo gram-negativo, aeróbico e anaeróbico facultativo, com forma de bastonete. Existem mais de 2.500 sorotipos já encontrados, contudo, apenas alguns destes sorotipos são reconhecidos por causarem risco à saúde humana (MAHMOUD, 2012). Esta bactéria é comumente encontrada no ambiente e no trato gastrointestinal de animais silvestres e

domésticos, roedores, pássaros e até mesmo dos humanos. Tal fato faz com que o solo e fontes de água sejam facilmente contaminados, podendo sobreviver por longos períodos no meio em que se encontra, apesar de sua multiplicação não ser tão significativa no ambiente (BELL & KYRIAKIDES, 2002). Os animais de criação, tais como aves e suínos, são os animais predominantemente hospedeiros de diversos sorovares de *Salmonella enterica*, sendo que, o atual sistema de criação animal intensivo acaba favorecendo a disseminação e prevalência desta bactéria, podendo ser considerado o ponto central na epidemiologia das salmoneloses entéricas (MAHMOUD, 2011).

Alguns sorovares de *Salmonella spp.* possuem alto grau de patogenicidade, como é o caso da *Salmonella enterica* sorovar Typhi, causadora da febre entérica. De acordo com Silva & Duarte (2002), pacientes portadores desta doença possuem sintomas como febre, diarreia, anorexia, cefaleia e, quando não tratada, a doença pode evoluir por meses ou anos resultando em diversas complicações clínicas que pode levar à morte do indivíduo. Embora muitas infecções por sorovares de salmonela não tifoides são facilmente controladas, contaminações por *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH) podem provocar infecções mais evasivas, como miocardite e bacteremia, sendo necessário tratamento com antibióticos de terceira geração (HOFFMANN, et al., 2014).

As aves podem apresentar três tipos de enfermidades causadas pela *Salmonella*. A pulorose, causada pela *S. Pullorum* (SP) o tifo aviário, causado pela *S. Gallinarum* (SG) e o paratifo aviário onde estão envolvidos os demais sorovares, incluindo *Salmonella Enteritidis* (SE) e *Salmonella Typhimurium* (ST). Destas, a SE tem grande destaque nos surtos alimentares em humanos. Dentre essas, a ST e SE destacam por se tratarem de patógenos de grande relevância em saúde pública; enquanto SP e SG por se tratarem de patógenos de grande relevância em saúde animal.

Nos últimos anos, SH está entre as cepas mais encontradas na produção animal e nos produtos da sua cadeia (VOSS RECH et al., 2019). A resistência desta bactéria aos antibióticos é um fator preocupante para a indústria e para a saúde pública, uma vez que, recentemente, diversos estudos têm avaliado a potencial resistência desta bactéria

aos antibióticos. Gieraltowski et al. (2017) avaliaram a resistência de 69 amostras de SH coletada de pacientes doentes e verificaram que 67% das cepas eram resistentes a antibióticos e, que destas, 35% eram multirresistentes. Taylor et al. (2015) isolaram 9 amostras de SH e descobriram que 2 destas eram multirresistente à cefalosporina e ceftriaxona, os quais são antibióticos de terceira geração. Tal fato desafia os produtores a melhorar sua produção em face à restrição de mercados quanto à utilização de antibióticos na criação animal, trazendo desafios para cadeia avícola no controle desta bactéria.

Dentre os principais agentes desinfetantes químicos utilizados atualmente na higienização de aviários, está a amônia quaternária (JAENISCH et al., 2010). Contudo, alguns estudos têm demonstrado a resistência de bactérias a esse produto. Colla et al. (2012) avaliaram três princípios ativos desinfetantes (clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético) frente a amostras de SH isoladas em dois diferentes anos (14 amostras de 2005 e 6 amostras de 2009) em quatro tempos distintos de contato (5, 10, 15 e 20 minutos). Verificaram que 100% das amostras de SH de 2005 tratadas com amônia quaternária foram sensíveis. Contudo, os isolados de 2009 apresentaram 33% de resistência com 5 minutos de contato e 16,6% com 10 minutos. Os resultados encontrados indicam possível aumento da resistência deste sorovar ao agente desinfetante ao longo dos anos devido a sua utilização constante.

Alali et al. (2012) avaliaram o efeito de 3 produtos não farmacêuticos no desempenho e liberação de SH nas fezes de aves de corte. Os tratamentos eram compostos de 4% de mistura de ácido orgânico; 0,025% de mistura de OEs (óleo essenciais) (composto majoritariamente por carvacrol, timol e eucaliptol) e 0,44% de ácido láctico. Os autores verificaram que as aves que receberam o tratamento com OEs apresentaram maior ganho de peso e menor mortalidade quando comparado aos outros produtos. Além disso constataram que, tanto no controle com ácido láctico quanto no controle com os OEs, houve diminuição significativa na liberação de SH nas fezes. Tais resultados sugerem que a utilização de óleos essenciais na avicultura pode ser uma

alternativa para a redução de contaminação de salmonela na produção de aves de corte, como também na redução do potencial de contaminação cruzada da carcaça quando as aves são abatidas e processadas. Em outro trabalho, Nair & Johny (2017) avaliaram a eficácia do óleo essencial extraído de folhas de *Pimenta officinalis* Lindl. e sua nanoemulsão em reduzir população de SH multiresistente aderidas a pele de perus (*Meleagris gallopavo*) durante simulações das etapas de escaldagem e resfriamento de carcaças que acontecem em abatedouros. Os autores verificaram potencial antibacteriano nas concentrações de 0,5 e 1% do óleo, concluindo que tal nanoemulsão pode ser utilizada para eliminar SH em peles de perus durante o processamento em plantas industriais.

Mercados para carne de frango livre de *Salmonella* abrem novos caminhos para uma produção sustentável e segura deste alimento. Na literatura há diversos trabalhos relatando atividade antibacteriana de OEs (MILLEZI et al., 2019; SPERANDIO et al., 2019; XIAOFENG et al., 2018; SZCZEPANSKI & LIPSKI, 2014) os quais são compostos secundários utilizados como mecanismos de defesa das plantas contra pragas, patógenos e até mesmo para atração de polinizadores (PAVELA, 2016). Wiest et al. (2009) avaliaram 86 plantas com indicativo medicinal no combate a *Salmonella spp*, *Salmonella enteritidis* e *Salmonella galinarum*. Estes autores relataram 50 extratos de plantas com possíveis atividade seletiva antissalmonela. Dentre estas plantas, destacaram-se a atividade do alho-porró (*Allium Porrum*), alho-nirá (*Allium tuberosum*), macela (*Achyrocline satureoides* Lam.), erva-mate (*Illex paraguariensis*), orégano (*Origanum applii*), sálvia (*Salvia oficialis*) e o chinchilho (*Tagetes minuta*).

Dentre plantas condimentares e medicinais com potencial atividade biológica contra micro-organismos está o *Thymus vulgaris*. Trata-se de uma planta pertencente à família *Lamiaceae*, sendo popularmente conhecido com tomilho. Sua utilização como condimento é disseminada globalmente, contudo é uma planta nativa do sul da Europa (MANDAL, 2016). Recentes estudos têm demonstrado resultados promissores na utilização do OE de *Thymus vulgaris* e compostos isolados do óleo em testes



antibacterianos *in vitro*, principalmente em bactérias gram-negativas (GEDIKOGLU et al., 2019, BOSKOVIC et al., 2015; ISEPPI et al., 2018). Entre os constituintes deste OE, destaca-se o timol, o qual representa mais de 50% dos terpenos sintetizados por essa espécie (BOSKOVIC et al., 2015). Contudo, ainda não há descrito na literatura a atividade deste óleo contra cepas isoladas de campo de SH, visando sua utilização como aditivo alimentar em dietas de frango de corte ou sanificante ambiental.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Geral

Avaliar *in vitro* a atividade antibacteriana do OE de *Thymus vulgaris* e timol contra *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg isolada de frango de corte visando sua utilização como aditivo antimicrobiano para ração.

### 2.2 Específicos

- Avaliar a citotoxicidade *in vitro* do OE de *Thymus vulgaris* e timol em células intestinais-IEC-6 e fibroblastos-NCTC;
- Analisar a atividade antibacteriana *in vitro* do OE de *Thymus vulgaris* e timol em diferentes concentrações contra células viáveis planctônicas de SH.

### 3 REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal, 2020. Relatório Anual de 2020. Disponível em: < [http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa\\_relatorio\\_anual\\_2020\\_portugues\\_web.pdf](http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf)> Acesso em: 1 mai. 2020.

ALALI, W. Q. et al. Effect of essential oil compound on shedding and colonization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in broilers. **Poult Sci.**, [S. l.], v. 92, p. 836-841, mar. 2013. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23436536/>. Acesso em: 1 abr. 2020.

BELL, C.; KYRIAKIDES, A. *Salmonella: A practical approach to the organism and its control in foods*. 1. Ed. Iowa, USA: **Iowa state university press**, 2002.

BOSKOVIC, M. et al. Antimicrobial Activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils against Some Food-borne Microorganisms. **Proc. Food Sci.** 5; 18 – 21, 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n.20, de 21 de outubro de 2016. Diário Oficial da União, Brasília 25 de outubro de 2016. Seção 1.

COLLA, F. L.; et al. Avaliação in vitro de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de *Salmonella Heidelberg* isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Pesq. Vet Bras.**, [S. l.], v. 32, p. 289-292, abr. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/pvb/v32n4/03.pdf>. Acesso em: 1 mar. 2020.

EPAGRI, 2017. Boletim Agropecuário de 2017.

GEDIKOĞLU, A; SÖKMEN, M; ÇIVIT, A. Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. **Food Sci Nutr.**;7:1704–1714, 2019.

GIERALTOWSKI, L. et al. National Outbreak of Multidrug Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to a Single Poultry Company. **Plos. one**, v.11, n.9, 2016.

HENTZ, S. M.; SANTIN, N. C.; Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. **Evidência**, v.7, n.2, p.93-100, 2007.

HOFFMANN, M., et al. Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates from humans, retail meats, and animals. **Genome Biol Evol**, v6, p.1046–68, 2014.

ISEPPI, R. et al., Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils and their combination against food-borne pathogens and spoilage bacteria in ready-to-eat vegetables. **Nat.Prod. Res.** V8, 79-89. 2018.

JAENISCH, F. R. F.; KUCHIISH, S. S.; COLDEBELLA, A. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 40, ed. 2, p. 384-388, fev. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cr/v40n2/a452cr2393.pdf>. Acesso em: 1 mar. 2020.

MAHMOUD, B. S. M. *Salmonella – A dangerous foodborn pathogen*. 1. Ed. Intech: Rijeka, Croatia, 2012.

MANDAL, S. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) oils. **V. R. Preedy**. Essential oils in food preservation, flavor and safety. London: Elsevier, p.825-834, 2016.

MILLEZI, F. M., et al. Antibacterial and anti-biofilm activity of cinnamon essential oil and eugenol. **Cienc. Rural**, v.49, n.1, 2019.

NAIR, D. V. T.; JOHNY, A. K. Food Grade Pimenta Leaf Essential Oil Reduces the Attachment of Salmonella enterica Heidelberg (2011 Ground Turkey Outbreak Isolate) on to Turkey Skin. **Front. Microbiol.**, [S. l.], v. 8, n. 2328, p. 1-15, nov. 2017. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2017.02328/full>. Acesso em: 1 abr. 2020.

PAVELA, R. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects – a review. **Plant Prot. Sci**, v.52, p.229-241, 2016.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. Salmonella Enteritidis em Aves: Retrospectiva no Brasil. **Rev. Bras. Cienc. Avic**, v.4, n.2, p.85-100, 2002 .

SPERANDIO, J. et al. Atividade antimicrobiana e citotoxicidade in vitro do óleo essencial de Tagetes minuta L. visando à aplicação no controle da mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet Zootec.**, Belo Horizonte, v. 71, n. 4, p. 1251-1259, Ago. 2019 Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352019000401251&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352019000401251&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 1 mar. 2020.

SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, v.36, p.224-229, 2014.

TAYLOR, A. et al. Multidrug-Resistant Salmonella Heidelberg Associated with Mechanically Separated Chicken at a Correctional Facility. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.12, n.9, p.950-952, 2015.

VOSS-RECH, D. et al. Longitudinal study reveals persistent environmental Salmonella Heidelberg in Brazilian broiler farms. **Vet Micr.**, [S. l.], ano 2019, v. 233, p. 118-123, abr. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113519301919?via%3Dihub>. Acesso em: 1 mar. 2020.

XIAOFENG Z. et al. In Vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Melaleuca alternifolia Essential Oil. **BioMed Research International**. v. 1 2018, p. 1-8 p

#### **4 BIOPROSPECÇÃO ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Thymus vulgaris* E TIMOL CONTRA *Salmonella enterica* SOROVAR HEIDELBERG ISOLADA DE FRANGO DE CORTE**

**Jhonatan Sperandio<sup>1</sup>, Ana Paula Almeida Bastos<sup>2</sup>, Francisco Noé da Fonseca<sup>2</sup>,  
Franciana Volpato Bellaver<sup>1</sup>, Thais Dal Bello<sup>1</sup>, Shirley Kuhnen<sup>3</sup>, Alessandra Farias  
Millezi<sup>1\*</sup>**

<sup>1</sup> Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia, Concórdia, SC

<sup>2</sup> Embrapa Suínos e Aves, Concórdia, SC

<sup>3</sup> Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC

\* Autor (a) correspondente

##### **4.1 Introdução**

Os animais de criação, tais como aves e suínos, são os animais predominantemente hospedeiros de diversos sorovares de *Salmonella enterica*, sendo que o atual sistema intensivo acaba favorecendo a disseminação e prevalência desta bactéria, podendo ser considerado o ponto central na epidemiologia das salmoneloses entéricas (MAHMOUD, 2011). Embora muitas infecções por sorovares de salmonela não-tifoïdes são facilmente controladas, contaminações por *Salmonella enterica* sorovar Heidelberg (SH) podem provocar infecções mais evasivas, como miocardite e bacteremia, sendo necessário tratamento com antibióticos de terceira geração (HOFFMANN, et al., 2014). Nos últimos anos, estudos têm demonstrado que SH está entre as cepas mais encontradas na produção animal e nos produtos da sua cadeia (VOSS-RECH et al., 2019).

A complexidade epidemiológica e a ausência de sinais clínicos e lesões em aves contaminadas por sorovares paratifoïdes, o que determina, na maioria dos casos,

frangos portadores assintomáticos que pode contribuir para a contaminação do produto final, interferindo na segurança alimentar são fatores preocupante para a indústria e para a saúde pública além da resistência das bactérias, uma vez que, recentemente, diversos estudos têm avaliado o potencial de resistência bacteriana aos antibióticos (GIERALTOWSKI et al., 2017; TAYLOR et al., 2015) e agentes desinfetantes (MACIEL et al., 2019; COLLA et al., 2011). A amônia quaternária, por exemplo, é um dos principais agentes desinfetantes utilizados atualmente na higienização de aviários (JAENISCH et al., 2010). Contudo, há relato de resistência de salmonela a este produto (COLLA et al., 2012). Tal fato desafia os produtores em face a restrição de mercados quanto à utilização de antibióticos na criação animal, trazendo desafios para a indústria de frangos no controle deste sorovar.

Mercados para carne de frango livres de *Salmonella* abrem novos caminhos para uma produção sustentável e segura deste alimento. Na literatura há diversos trabalhos relatando atividade antibacteriana de óleo essenciais (OEs) (MILLEZI et al., 2019; SZCZEPANSKI & LIPSKI, 2014, SPERANDIO et al., 2019; XIAOFENG et al., 2018) os quais são compostos do metabolismo secundário utilizados, por exemplo, como mecanismos de defesa das plantas contra pragas e patógenos (HARBORNE, 1989; PAVELA, 2016).

*Thymus vulgaris* é uma planta pertencente à família *Lamiaceae*, nativa do sul da Europa, popularmente conhecida como tomilho. Sua utilização como condimento é disseminado globalmente (MANDAL, 2016). Recentes estudos têm demonstrado resultados promissores na utilização do óleo essencial de *Thymus vulgaris* (OET), em testes antibacterianos *in vitro*, principalmente contra bactérias gram-negativas (GEDIKOGLU et al., 2019, BOSKOVIC et al., 2015; ISEPPI et al., 2018). Entre os constituintes deste óleo, destaca-se o timol (2-isopropil-5-metil-fenol), o qual representa mais de 50% dos terpenos (BOSKOVIC et al., 2015), sendo comumente o componente majoritário encontrado nos OE de plantas da família *Lamiaceae*. O timol é um monoterpene biosintetizado pela aromatização de  $\gamma$ -terpineno para p-cimeno seguido de hidroxilação do p-cimeno (POULOSE & CROTEAU, 1978).



Ainda não está descrito na literatura a atividade do OET e timol frente a cepas de SH isoladas de campo, visando a utilização como aditivo alimentar para ração ou agente desinfetante. Dessa forma, o objetivo desse estudo foi avaliar *in vitro* a atividade do OET e timol contra SH isolada de frango de corte.

## **4.2 Material e Métodos**

### **4.2.1 Local de condução dos experimentos: coleta, PCR, análises microbiológicas, citotoxicidade**

A coleta de bactérias foi realizada nos municípios de Ipumirim/SC e Seara/SC entre os anos de 2017 e 2018. A Identificação das salmonelas foi feita no laboratório de Saúde Animal Seara, no município de Seara/SC. Os testes de atividade antibacteriana foram realizados no Laboratório de Biologia do Instituto Federal Catarinense em Concórdia/SC. Os testes de citotoxicidade foram feitos na Embrapa suínos e aves em Concórdia/SC.

### **4.2.2 Óleo essencial (OE) e timol**

O OE de *Thymus vulgaris* (OET) foi adquirido da empresa Ferquima (Vargem Grande, SP, Brasil) e sua composição química, de acordo com o fornecedor, está descrita na tabela 1. Timol PA também foi adquirido comercialmente (Dinâmica, Brasil).

Tabela 1. Composição química do OET

Pico	Constituinte	%
1	$\alpha$ -pineno	2,2
2	canfeno	0,8
3	Mirceno	1,4
4	p-cimeno	26,8
5	1,8-cineol	1,3
6	$\gamma$ -terpineno	6
7	linalol	5,2
8	canfora	1,5
9	borneol	0,9
10	timol	47,3
11	carvacrol	3,1
12	$\beta$ -cariofileno	0,8

Fonte: Laboratório de Cromatografia, Departamento de Química – UFMG

#### 4.2.3 Emulsão a base de OET e timol

As soluções foram adaptadas de Millezi et al. (2012) com modificações (utilizou-se como diluente etanol PA). O OET foi diluído nas concentrações de 0,1%, 0,2%, 0,4% e 0,8% (v/v) em meio de TSB (*Tryptone Soy Broth*) (Fluka, Índia) a partir de solução estoque de OET (solução a 2,5% (v/v) de TOE em etanol PA (Merck, Alemanha) e água salina 0,85% (v/v)). O timol também foi diluído em meio de TSB a partir de solução estoque a 2,5% (v/v) de timol em etanol PA e água salina a 0,85% (v/v) nas concentrações de 0,023%, 0,047%, 0,047%, 0,071% e 0,094% (v/v). Tais concentrações foram baseadas nas concentrações de timol presente no OET (47,3%), ou seja, a concentração de 0,094% de timol equivale a concentração de 0,2% do OET

#### 4.2.4 Obtenção, identificação e manutenção de cepas bacterianas

5 cepas de SH foram cedidas por uma empresa do ramo de abate e processamento de aves da região dos municípios de Seara e Ipumirim, SC, entre os anos de 2017 e 2018, a partir de amostras de propé pré-abate, coletadas com suabe de arrasto em cama de aviário de frango de corte. As bactérias foram identificadas através

da metodologia de PCR (*polymerase chain reaction*) (referência da metodologia do PCR). As cepas de SH foram mantidas sob congelamento em freezer -80 °C. Para a reativação das bactérias, foram inoculados 10 µL de cada cultura em tubos contendo 4 mL de caldo TSB (Fluka, Índia) e incubados, por 24 h/ à 37 °C. Após a incubação, foi realizada semeadura por estria simples dos inóculos em meio de cultura sólido TSA (*Trypticase Soy Agar*; Acumedia, Brasil).

#### **4.2.5 Avaliação da atividade antimicrobiana mediante quantificação de UFCs**

Após a padronização do inóculo, procedeu-se à inoculação em microplacas de polipropileno de 96 cavidades, sendo incubadas em BOD por 24 h, contendo os tratamentos com as soluções de OET, timol, controle positivo (suspensão bacteriana em meio BHI (Oxoid, Inglaterra), sem óleo e sem timol) e controles contendo água destilada esterilizada em substituição às alíquotas correspondentes de OE e timol de cada concentração (Millezi et al., 2012).

Para a quantificação de células planctônicas, coletou-se 100 µL do sobrenadante de cada poço, realizou-se a diluição seriada e plaqueamento em meio TSA (Acumedia, Brasil), empregando-se a técnica de microgota (Herigstad et al., 2001). As placas foram incubadas a 37°C. Após 24 horas, foi realizada a contagem em placas e os valores expressos em UFC/mL.

#### **4.2.6 Cultivo celular**

Para os testes de citotoxicidade foram cultivados fibroblastos de linhagem NCTC e células epiteliais de intestino de linhagem IEC-6 (*Intestinal Epithelial Cell*), nas passagens 46 e 23, respectivamente. As células foram cultivadas em monocamadas, em frascos de cultivo celular estéreis, mantidas em meio DMEM High (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, INLAB Diagnóstica) suplementado com 10% de SFB (soro bovino fetal,

Gibco) e mantidas em estufa úmida a 37°C com 5% de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>). Quando o crescimento celular apresentou confluência aproximada de 90%, as células foram removidas do frasco de cultura por tripsinização. Esta suspensão foi, então, centrifugada a 300g por 5 minutos, e o pellet contendo as células foi ressuspendido em 1mL de DMEM High. Da suspensão obtida, retirou-se uma alíquota e quantificou-se em um contador automático de células (Moxi, Orflo). Com base no número de células contadas, foi realizada a diluição com meio DMEM High suplementado com 10% de SFB, a fim de se obter uma suspensão contendo 1×10<sup>5</sup> células viáveis/poço. A suspensão foi dispensada numa placa de 96 poços, a qual foi mantida por aproximadamente 24 horas na estufa a 37°C e 5% de CO<sub>2</sub>, até que a confluência das células atingisse aproximadamente 80-90%. Alguns poços receberam apenas 100 µL de meio RPMI (sem células) para servir de branco e controle.

OET e timol foram diluídos em meio 0,67% de DMSO e álcool etílico à 25% na faixa de concentração de 0,5, 0,25, 0,125 e 0,0625%. A Figura 1 apresenta a distribuição dos tratamentos na placa de 96 poços conforme a seguir: após as células adquirirem confluência, foi descartado o meio DMEM e colocado 100µL de meio RPMI 1640 nos poços cor-de-laranja (ensaios em branco), 100 µL de meio RPMI 1640 nos poços cor-de-rosa (poços controles contendo células), 100 µL de cada concentração da formulação das emulsões nos poços em verde (sem células) e nos poços roxos (contendo células). As placas foram colocadas na estufa com 5% de CO<sub>2</sub>, a 37°C, por 24 h.

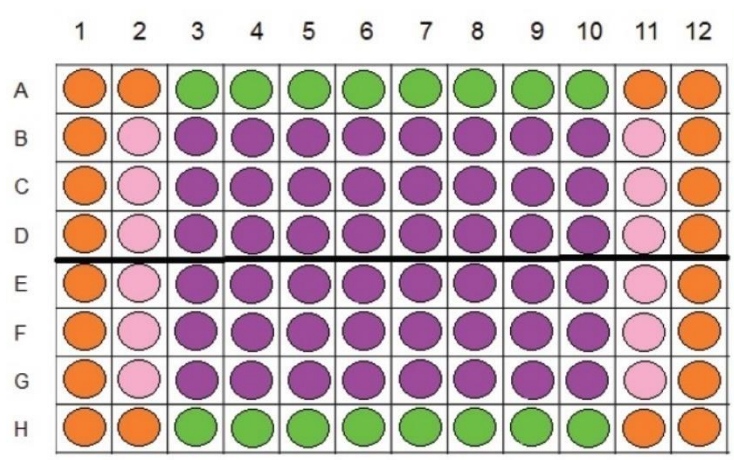


Figura 1: Esquema de montagem da placa de 96 poços para testes de atividade citotóxica.

#### 4.2.7 Avaliação da citotoxicidade pelo método de MTT

As células expostas, por 24 horas, às emulsões, foram submetidas à avaliação da viabilidade celular pelo método de brometo de 3-4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazólio (MTT) (Sigma-Aldrich) para verificar a concentração inibitória de 50% de crescimento celular ( $IC_{50}$ ). Assim, as células viáveis reduzem o MTT (amarelo) e formam o formazan (cristais de cor azul; Reuter et al., 2008). Primeiramente, removemos o meio de cultura, lavamos duas vezes os poços com DPBS estéril a temperatura de 37°C. Posteriormente, adicionamos 90  $\mu$ L de RPMI e 10  $\mu$ L da solução de MTT (5 mg/mL) em todos os poços. A placa foi incubada por duas horas em estufa úmida a 37°C com 5% de  $CO_2$ . Na sequência, o meio foi removido e as placas foram submetidas à agitação com 100  $\mu$ L de dimetilsulfóxido (DMSO, MP Biomedicals) por 5 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 540 nm.

Por fim, a citotoxicidade foi calculada conforme a equação a seguir:

$$\text{Viabilidade celular: } \frac{a-b}{c} \times 100$$

Onde:  $a$  é a absorbância da amostra,  $b$  a absorbância do branco e  $c$  a absorbância do controle. Através dos resultados obtidos por esta fórmula, foi feito o cálculo do  $IC_{50}$ , que significa a concentração do extrato que induz a 50% de lise celular, por meio do programa Prism 8 (Graph Pad, San Diego, CA).

#### 4.2.8 Análise estatística

Os resultados da atividade antibacteriana foram analisados através da Análise de Variância (ANOVA), teste de Dunnett's, comparando-se o controle com as concentrações de tratamentos, considerando significativo  $P < 0,05$ . As análises foram realizadas em triplicata e com três repetições. Para a o teste de citotoxicidade, os tratamentos foram feitos em seis réplicas e as médias analisadas através da análise de variância (ANOVA) seguido pelo teste de Tukey ( $P < 0,05$ ). Todos os dados foram analisados usando o software Prism 8 (Graph Pad, San Diego, CA).

### 4.3 Resultados

O efeito antibacteriano do OET mostrou controle significativo de SH a partir da concentração de 0,2% ( $P < 0,05$ ), variando conforme a cepa. A partir da concentração de 0,2% de OET, 50% das cepas avaliadas tiveram seu crescimento reduzido. Os outros 50% das bactérias, apresentaram redução de crescimento a partir de 0,1% (figura 2). Em contrapartida, o timol apresentou diferença significativa no controle de crescimento dos isolados de SH. Das 6 cepas, 2 tiveram o crescimento reduzido a partir da concentração de 0,047% (E e F), 1 cepa a partir da concentração de 0,071% (A), 2 cepas a partir da concentração de 0,094% (C e D) e 1 cepa não foi inibida nas concentrações testadas (B). É válido salientar, contudo, que 83,33% das cepas testadas apresentaram inibição do crescimento bacteriano na concentração de 0,094% de timol (figura 3).

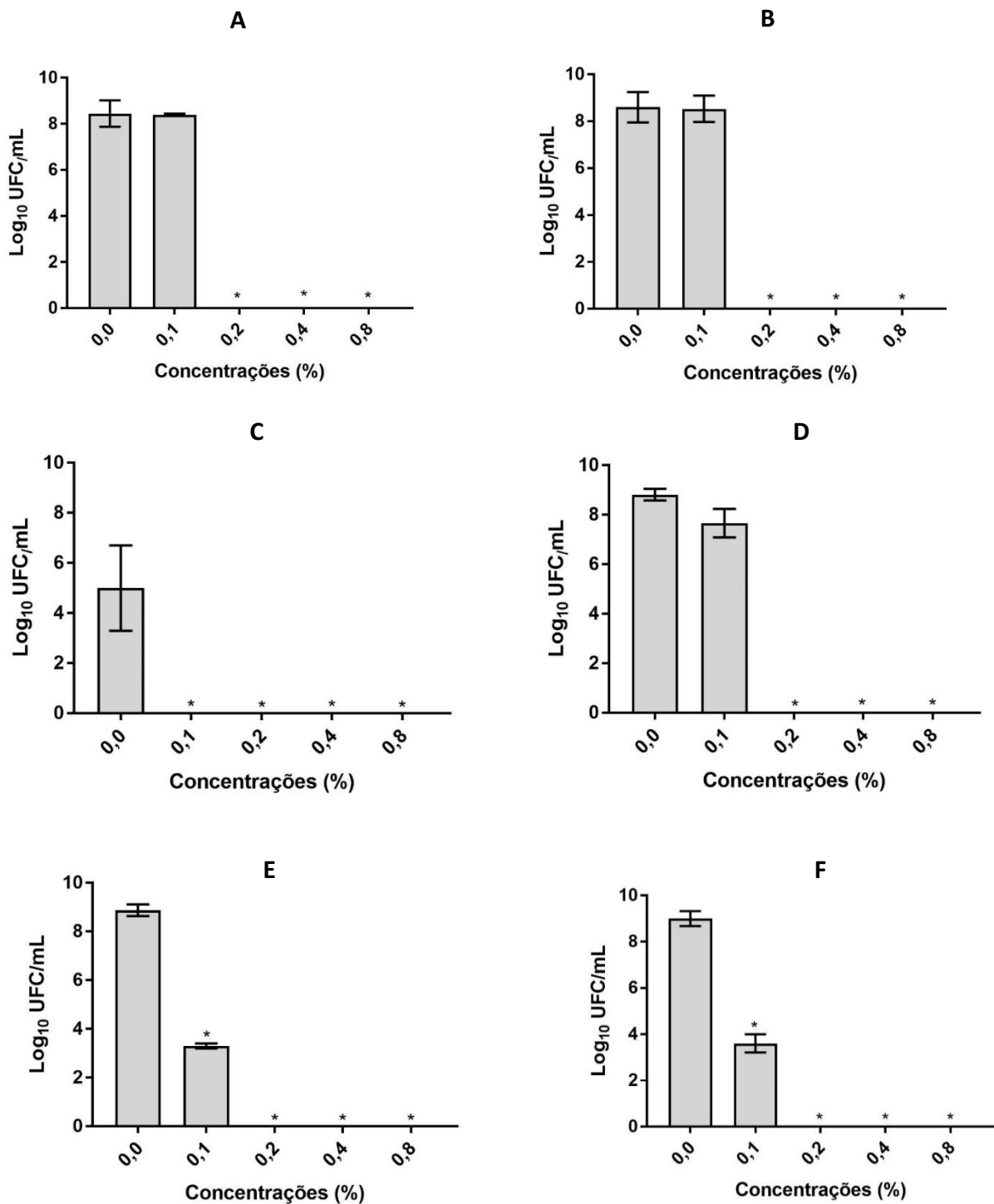


Figura 2. Crescimento de UFCs de SH sob tratamentos em diferentes concentrações de OET. (A) SH ATCC 8326; (B) SH SI01; (C) SH SI02; (D) SH SI03; (E) SH SS01; (F) SH SS02.

\* $P < 0,05$  pelo teste de Dunnett's (ANOVA).

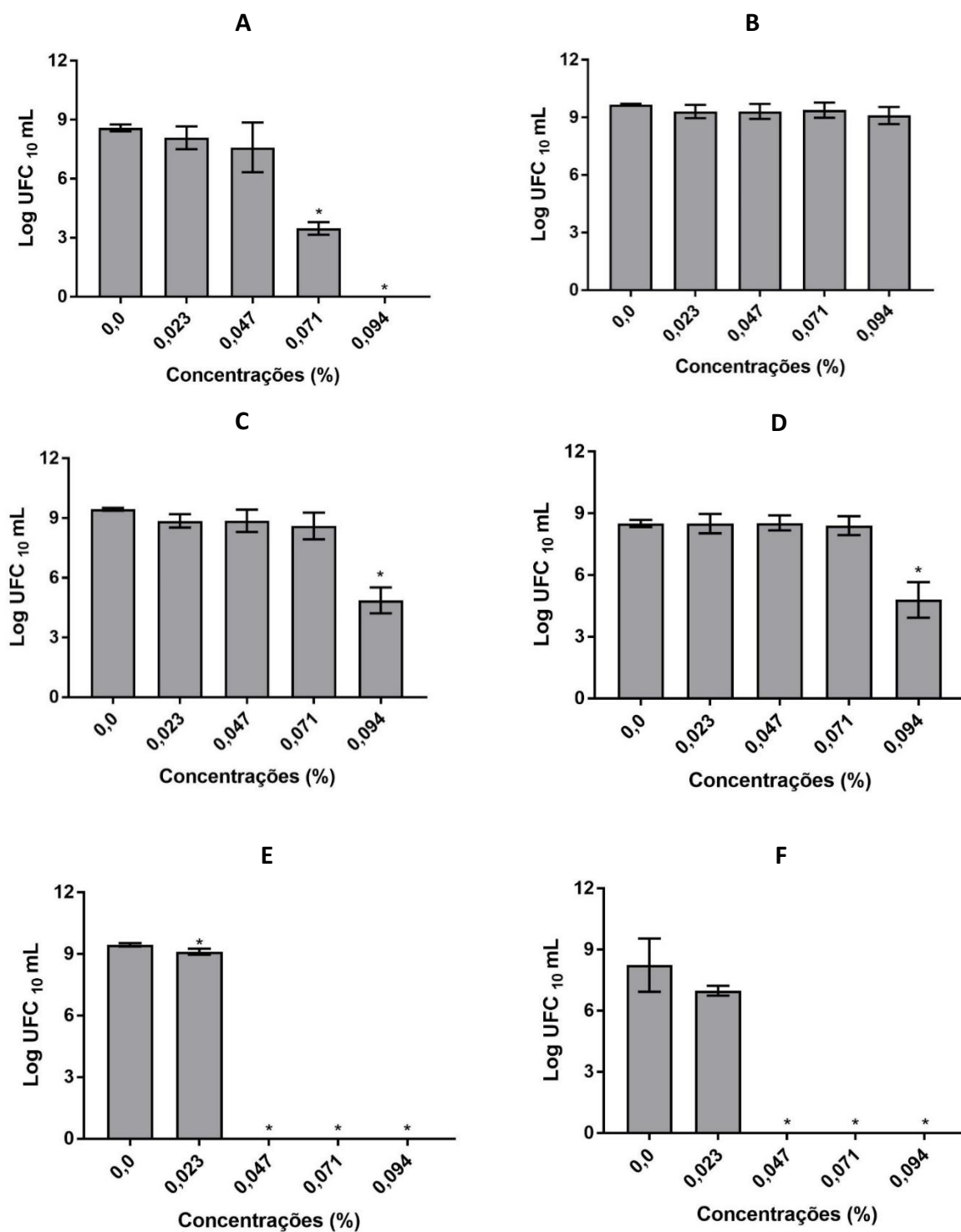


Figura 3. Crescimento de UFCs de SH sob tratamentos em diferentes concentrações de timol. (A) SH ATCC 8326; (B) SH SI01; (C) SH SI02; (D) SH SI03; (E) SH SS01; (F) SH SS02. \* $P < 0,05$  pelo teste de Dunnett's (ANOVA).



O teste de viabilidade celular em células IEC-6 demonstrou certa toxicidade nas concentrações testadas. Enquanto o  $IC_{50}$  do OET foi de 0,14% em 24 h, para o timol foi de 0,069% (figura 4). Por outro lado, quando os mesmos substratos foram expostos às células de fibroblastos NCTC, OET apresentou um  $IC_{50}$  de 1,23% e e de 0,001% para o timol (figura 5), mostrando menor toxicidade do OET perante este tipo celular, mas elevada citotoxicidade ao timol.

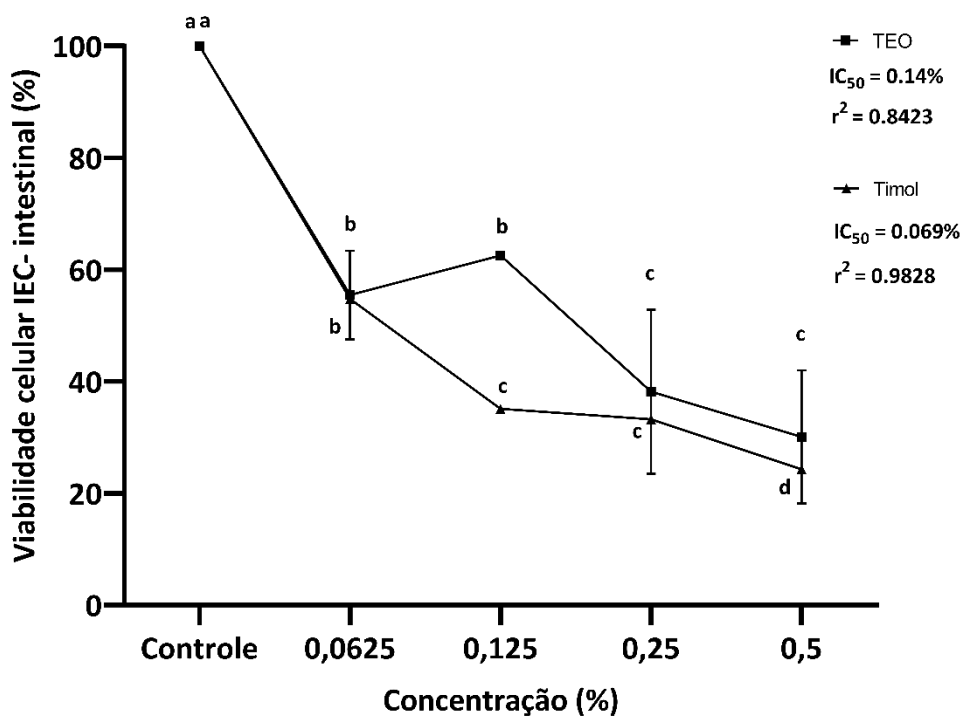


Figura 4. Viabilidade das células IEC-6 após exposição ao OET e timol nas concentrações de 0,5%, 0,25%, 0,125% e 0,0625% em 24 h. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre as concentrações ( $P < 0,05$ )

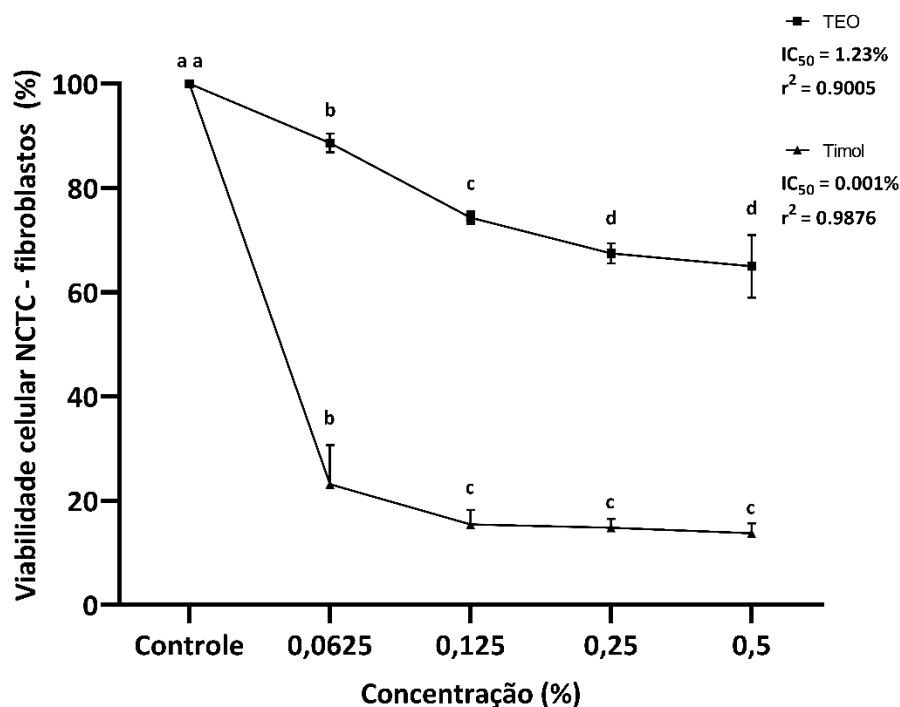


Figura 5. Viabilidade das células Fibroblastos-NCTC ao OET e timol nas concentrações de 0,5%, 0,25%, 0,125% e 0,0625% em 24 h. Letras minúsculas diferentes representam diferenças estatísticas entre as concentrações ( $P < 0,05$ )

#### 4.4 Discussão

Nos últimos anos, SH está entre as cepas mais encontradas na produção animal e nos produtos da sua cadeia (VOSS-RECH et al., 2019). A resistência desta bactéria aos antibióticos é um fator preocupante para a indústria e para a saúde pública, uma vez que, recentemente, diversos estudos têm avaliado a potencial de resistência desta bactéria aos antibióticos. Gieraltowski et al. (2017) avaliaram a resistência de 69 amostras de SH coletada de pacientes doentes e verificaram que 67% das cepas eram resistentes a antibióticos e, que destas, 35% eram multirresistentes. Taylor et al. (2015) isolaram 9 amostras de SH e descobriram que 2 destas eram multirresistente à cefalosporina e ceftriaxona, os quais são antibióticos de terceira geração. Tal fato

desafia os produtores a melhorar sua produção em face à restrição de mercados quanto à utilização de antimicrobianos na avicultura, principalmente como promotores de crescimento, trazendo desafios para a indústria de frangos no controle de vários microorganismos, inclusive a salmonella.

Há diversos estudos sobre a atividade antibacteriana de óleos essenciais (citar 4 trabalhos recentes, que já estão na sua lista de referências), especialmente com OET (citar 2 ou 3 trabalhos recentes) e timol (citar 2 trabalhos recentes), entretanto há escassez de pesquisas sobre a atividade dos compostos usados nesse trabalho contra SH. Peichel et al. (2019) testaram o efeito do OE de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) contra cepas de SH multirresistente, inoculadas na água de beber de frangos de corte, verificando inibição de crescimento bacteriano na concentração de 0,25% do OE em 24 h. Em nosso estudo, OET na concentração de 0,2% foi capaz de controlar o crescimento bacteriano de 100% das cepas de SH testadas. Boskovic et al. (2015) avaliando o efeito do óleo de *Thymus vulgaris* contra *S. Enteritidis* e *S. Thyphimurium* encontraram inibição na concentração de 0,032%, concentração ainda menor do que as utilizadas neste estudo. Tal atividade baixa se deve provavelmente pela diferença das cepas testadas ou pela composição um pouco diferente do óleo que utilizaram (composto por 50,48% de timol; 24,79% de p-cimeno; 4,69% de linalol; 4,14% de  $\gamma$ -terpineno; e 4,35% de 1,8-cineol), mas comprova que há possibilidade de usar o óleo contra outras espécies de *Salmonella*.

Considerando que o óleo testado possui 47,3% de timol, a concentração de 0,2% de TOE, que controlou todas as cepas, comparando-se com o teste em que foi utilizado o timol, verificou-se efeito antibacteriano em 83,33% das cepas estudadas na concentração de 0,094%. Tal fato conclui que o timol isolado não foi tão eficiente quanto o OET frente as cepas de SH estudadas. Há evidências de que ocorre sinergismo entre os monoterpenos presentes na constituição do óleo, provavelmente por isto o OET demonstra a atividade antimicrobiana significativamente melhor do que o timol. Estudos como os realizados por Donato et al. (2015), em que foi avaliado efeito

antibacteriano do OE de *Artemisia annua* e três dos componentes majoritários do óleo (isoartemisiacetona, eucaliptol e cânfora) contra *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13311) e *Salmonella* Typhi (ATCC 19430), verificaram que o OE diminuiu o crescimento bacteriano com concentrações menores quando comparado ao seu terpeno majoritário.

Sugere-se que a variação do efeito inibitório encontrada entre as cepas pode ocorrer devido à variação genética, uma vez que foram avaliados cinco isolados de campo de diferentes propriedades avícolas e a cepa ATCC. Variações genéticas entre bactérias de mesma família são bastante comuns, já que cepas isoladas a campo tendem a possuir maior virulência e resistência por estarem sujeitas a diversidades do ambiente. Sperandio et al. (2019), avaliaram a atividade do OE de *Tagetes minuta* contra cepas de *Escherichia coli* isoladas de leite mastítico e verificaram que houve diferença estatística da concentração inibitória mínima entre a cepa ATCC e os isolados. Enquanto a cepa padrão apresentou inibição em 1mg/mL do óleo testado, as bactérias isoladas só tiveram seu crescimento reduzido a partir da concentração de 3mg/mL.

O grande desafio na utilização de OEs e seus compostos versa sobre ajustar concentrações que sejam efetivamente antibacterianas e não sejam citotóxicas para animais e humanos. Os resultados relativos à concentração que causa a inibição de 50% do crescimento celular ( $IC_{50}$ ), demonstraram maior citotoxicidade do timol perante os tipos celulares utilizados neste trabalho, quando comparados ao OET. O  $IC_{50}$  para o timol foi de 0,069% e 0,001% em células IEC-6 e fibroblastos, respectivamente. Comparando estes resultados com a concentração de inibição de crescimento bacteriano do timol, que foi de 0,094%, verifica-se inviabilidade da utilização deste substrato em frangos de corte, tanto interno quanto externo. Alguns estudos demonstram que o timol aumenta a incidência de morte celular por apoptose quando testado em células do tipo Caco-2 (que são células intestinais humana) nas mesmas concentrações em que apresentam bom efeito antimicrobiano (LLANA-RUIZ-CABELLO et al, 2014; DUSAN et al., 2006).

Para o OET, O  $IC_{50}$  encontrado foi de 0,14% para as células IEC-6 e 1,23% para os fibroblastos. Esses dados foram superiores aos encontrados no timol. Contudo,

considerando que a concentração de 0,2% de OET foi a que obteve um resultado de 100% de inibição de crescimento bacteriano de SH, a utilização deste OE não é recomendada ao tratamento interno para reduzir crescimento de SH. Em contrapartida, baixa citotoxicidade do OE foi verificada em células fibroblastos. Oliveira et al. (2017) analisaram diferentes concentrações de extratos do OE de *Thymus vulgaris* em fibroblastos gengivais humanos (FMM-1), macrófagos (RAW264.7), células de carcinoma mamário (MCF-7) e células de carcinoma uterinos (HeLa). Os autores verificaram que, após 5 minutos de exposição ao extrato, a maior concentração testada (1,0%) apresentou viabilidade celular acima de 50%. O presente trabalho mostrou que para inibir 50% do crescimento celular, seria necessária uma concentração de 1,23% do OE, concentração 6x superior ao mínimo necessário para inibir todas as cepas de SH testadas.

Estes estudos demonstram que SH é uma cepa susceptível aos óleos essenciais e que tais compostos possuem a capacidade de redução/inibição do crescimento de SH em planteis de frango de corte.

#### **4.5 Conclusão**

O OET controlou todas as cepas de *Salmonella enterica* Sorovar *Heidelberg* em 0,2% de concentração, apresentando baixa citotoxicidade de células de fibroblastos. O timol isolado, por outro lado, não controlou todas as cepas estudadas e apresentou certa citotoxicidade perante as linhagens celulares avaliadas.

## **5 CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A atividade antibacteriana foi encontrada em melhores concentrações com os tratamentos utilizando o OET quando comparado ao timol isolado, uma vez que o óleo controlou todas as cepas estudadas em 0,2%. Tais resultados indicam potencial utilização do OET como um composto desinfetante para instalações avícolas que apresentem positividade para SH, em substituição ou complementação aos atuais agentes desinfetantes utilizados. Embora o timol apresentou citotoxicidade, sua utilização como agente antimicrobiano não pode ser descartada e estudos com diferentes concentrações devem ser executados. Pesquisas investigação a ação da nano encapsulação do óleo e variações do tempo de contato com as bactérias devem ser executados para melhor entendimento da atividade do OET e timol perante tais microrganismos.

## 6 REFERÊNCIAS

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal, 2020. Relatório Anual de 2020. Disponível em: < [http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa\\_relatorio\\_anual\\_2020\\_portugues\\_web.pdf](http://abpa-br.org/wp-content/uploads/2020/05/abpa_relatorio_anual_2020_portugues_web.pdf)> Acesso em: 1 mai. 2020.

BOSKOVIC, M. et al. Antimicrobial Activity of Thyme (*Tymus vulgaris*) and Oregano (*Origanum vulgare*) Essential Oils against Some Food-borne Microorganisms. **Proc. Food Sci.** 5; 18 – 21, 2015.

COLLA, F. L.; et al. Avaliação in vitro de clorexidina, amônia quaternária e ácido peracético frente a amostras de Salmonella Heidelberg isoladas de abatedouro avícola em 2005 e 2009. **Pesq. Vet Bras.**, [S. l.], v. 32, p. 289-292, abr. 2012. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/pvb/v32n4/03.pdf>. Acesso em: 1 mar. 2020.

DONATO, R. et al. Antibacterial activity of Tuscan Artemisia annua essential oil and its major components against some foodborne pathogens. **Food Science and Technology**, [S. l.], v. 64, n. 2, p. 1251-1254, dez. 2015. Disponível em: [https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815300335?casa\\_token=uwsgQs-mtscAAAAA:O1Tc13tvAtWxPQ4sstROPtmkg6os2Wub-fm8SPdqxrjGn6EUTaIVqLEFhZKa3KvNYTFhDaKqQXk](https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815300335?casa_token=uwsgQs-mtscAAAAA:O1Tc13tvAtWxPQ4sstROPtmkg6os2Wub-fm8SPdqxrjGn6EUTaIVqLEFhZKa3KvNYTFhDaKqQXk). Acesso em: 19 jul. 2020.

DUŠAN, F. et al. Essential oils—their antimicrobial activity against Escherichia coli and effect on intestinal cell viability. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 20, n. 8, p. 1435-1445, dez. 2006. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0887233306001330>. Acesso em: 19 jul. 2020.

GEDIKOĞLU, A; SÖKMEN, M; ÇIVIT, A. Evaluation of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and plant extracts for chemical composition, antioxidant, and antimicrobial properties. **Food Sci Nutr.**;7:1704–1714, 2019.

GIERALTOWSKI, L., et al. National Outbreak of Multidrug Resistant *Salmonella* Heidelberg Infections Linked to a Single Poultry Company. **Plos. one**, v.11, n.9, 2016.

HARBORNE, J.B. *Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis*. Chapman and Hall. 288p 1988.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **J Microbiol Methods**, v.44, n.2, p.121-129, 2001.

HOFFMANN, M., et al. Comparative genomic analysis and virulence differences in closely related *Salmonella enterica* serotype Heidelberg isolates from humans, retail meats, and animals. **Genome Biol Evol**, v6, p.1046–68, 2014.

ISEPPI, R. et al., Antibacterial activity of *Rosmarinus officinalis* L. and *Thymus vulgaris* L. essential oils and their combination against food-borne pathogens and spoilage bacteria in ready-to-eat vegetables. **Nat.Prod. Res.** V8, 79-89. 2018.

JAENISCH, F. R. F.; KUCHIISH, S. S.; COLDEBELLA, A. Atividade antibacteriana de desinfetantes para uso na produção orgânica de aves. **Ciência Rural**, [s. l.], v. 40, ed. 2, p. 384-388, fev. 2010. Disponível em: <https://www.scielo.br/pdf/cr/v40n2/a452cr2393.pdf>. Acesso em: 1 mar. 2020.

LLANA-RUIZ-CABELL, M. et al. Cytotoxicity and morphological effects induced by carvacrol and thymol on the human cell line Caco-2. **Food and Chemical Toxicology**, [S. l.], v. 64, p. 281-290, fev. 2014. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278691513008272>. Acesso em: 19 jul. 2020.



MACIEL, M. J.; MACHADO, G.; AVANCINI, C. A. M. Investigation of resistance of Salmonella spp. isolated from products and raw material of animal origin (swine and poultry) to antibiotics and disinfectants. **Rev. bras. saúde prod. anim.**, Salvador, v. 20, e0162019, 2019. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1519-99402019000100400&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1519-99402019000100400&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em 19 July 2020.

MAHMOUD, B. S. M. Salmonella – A dangerous foodborn pathogen. 1. Ed. Intech: Rijeka, Croatia, 2012.

MANDAL, S. Thyme (*Thymus vulgaris* L.) oils. **V. R. Preedy**. Essential oils in food preservation, flavor and safety. London: Elsevier, p.825-834, 2016.

MILLEZI, A. F. et al. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils thymus vulgaris, cymbopogon citratus and laurus nobilis against five important foodborne pathogens. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.32, n.1, p.167-172, Mar. 2012. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612012000100025&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612012000100025&lng=en&nrm=iso)>. Acesso em: 19 jul. 2020.

MILLEZI, F. M., et al. Antibacterial and anti-biofilm activity of cinnamon essential oil and eugenol. **Cienc. Rural**, v.49, n.1, 2019.

OLIVEIRA, J. R. et al. Thymus vulgaris L. extract has antimicrobial and anti-inflammatory effects in the absence of cytotoxicity and genotoxicity. **Archives of Oral Biology**, [S. l.], v. 82, p. 271-279, out. 2017. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000399691730208X>. Acesso em: 19 jul. 2020.

PAVELA, R. History, presence and perspective of using plant extracts as commercial botanical insecticides and farm products for protection against insects – a review. **Plant Prot. Sci**, v.52, p.229-241, 2016.

PEICHEL, C. et al. Effect of Lemongrass (*Cymbopogon citratus*) Essential Oil on the Survival of Multidrug-Resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in Contaminated Poultry Drinking Water. **Journal of Applied Poultry Research**, [S. l.], v. 28, n. 4, p. 1121-1130, dez. 2019. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1056617119322779>. Acesso em: 19 jul. 2020.

POULOSE, A. J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of  $\gamma$ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 187, n. 2, p. 307-314, 30 abr. 1978. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/0003986178900395>. Acesso em: 19 jul. 2020.

REUTER, S.; EIFES, S.; DICATO, M. et al. Modulation of anti-apoptotic and survival pathways by curcumin as a strategy to induce apoptosis in cancer cells. **Biochem. Pharmacol.**, v.76, p.1340-1351, 2008.

SPERANDIO, J. et al. Atividade antimicrobiana e citotoxicidade in vitro do óleo essencial de *Tagetes minuta* L. visando à aplicação no controle da mastite bovina. **Arq. Bras. Med. Vet Zootec.**, Belo Horizonte, v. 71, n. 4, p. 1251-1259, Ago. 2019 Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0102-09352019000401251&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-09352019000401251&lng=en&nrm=iso). Acesso em: 1 mar. 2020.

SZCZEPANSKI, S.; LIPSKI, A. Essential oils show specific inhibiting effects on bacterial biofilm formation. **Food Control**, v.36, p.224-229, 2014.

TAYLOR, A. et al. Multidrug-Resistant *Salmonella* Heidelberg Associated with Mechanically Separated Chicken at a Correctional Facility. **Foodborne Pathogens and Disease**, v.12, n.9, p.950-952, 2015.

VOSS-RECH, D.; KRAMER, B.; SILVA, V.; REBELATTO, R.; ABREU, P. G.; COLDEBELLA, A.; VAZ, C.S. L. Longitudinal study reveals persistent environmental Salmonella Heidelberg in Brazilian broiler farms. **Vet Micr.**, [S. l.], ano 2019, v. 233, p. 118-123, abr. 2019.

Disponível em:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113519301919?via%3Dihub>.

Acesso em: 1 mar. 2020.

XIAOFENG Z.; GUO Y.; GUO L.; JIANG H.; JI Q. In Vitro Evaluation of Antioxidant and Antimicrobial Activities of Melaleuca alternifolia Essential Oil. **BioMed Research International**. v. 1 2018, p. 1-8 p