

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MILENA MATESCO CARRETEIRO

**ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* NO CONTROLE DE
Salmonella: AÇÃO EM SUPERFÍCIE E ESTUDO SINÉRGICO**

LONDRINA

2023

MILENA MATESCO CARRRETEIRO

**ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* NO CONTROLE DE
Salmonella: AÇÃO EM SUPERFÍCIE E ESTUDO SINÉRGICO**

**Organic acids and *Melaleuca alternifolia* oil in *Salmonella* control: surface
action and synergistic study**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos do Curso Superior em Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR campus Londrina.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Luciana Furlaneto Maia

LONDRINA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite remixe, adaptação e criação a partir do trabalho, para fins não comerciais, desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es) e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.

MILENA MATESCO CARRETEIRO

**ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* NO CONTROLE DE
Salmonella: AÇÃO EM SUPERFÍCIE E ESTUDO SINÉRGICO**

Trabalho de Conclusão de Curso de graduação apresentado como requisito para obtenção do título de Tecnólogo em Alimentos do Curso Superior em Tecnologia em Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - UTFPR campus Londrina.

Data de aprovação: 28 de novembro de 2023.

Luciana Furlaneto Maia
Doutora em Biologia Celular e Molecular
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Isabel Craveiro Moreira Andrei
Doutora em Química Orgânica
Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Mônica Lúcia Adam
Doutora em Ciências Biológicas
Universidade Federal de Pernambuco

LONDRINA

2023

RESUMO

Em razão da *Salmonella* ser uma bactéria de preocupação mundial por ser a principal causadora de doenças transmitidas por alimentos, faz-se necessário o controle deste microrganismo. A ração animal vem sendo identificada como a maior fonte de propagação desta bactéria, portanto é importante alternativas para mitigar o patógeno ao longo da cadeia produtiva. Os ácidos orgânicos encapsulados, como ácido acético, ácido propiônico, já são de utilização na ração animal, porém, já foram relatados casos de resistência da bactéria a esses compostos. Dessa forma, o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, possui propriedade antimicrobiana frente a *Salmonella*, principalmente devido ao seu composto 4-terpineol. Dentro desse contexto, o objetivo deste trabalho é verificar a ação sinérgica entre o óleo de *Melaleuca* e os ácidos orgânicos e seus sais. Os testes aplicados foram, atividade sanitizante entre ácido orgânico encapsulado e sais de ácidos líquido, como lactato de sódio e propionato de cálcio, onde observou-se que os sais de ácidos, mostraram eficiência em todas as concentrações testadas, enquanto o ácido orgânico encapsulado não apresentou eficiência em nenhuma concentração. O teste de poço de difusão evidenciou que o ácido encapsulado indicou ausência de eficácia na inibição do crescimento bacteriano para a concentração de 3mg, no entanto, com a concentração elevada para 50mg, observamos a formação de halo. Já o sal de ácido, nas concentrações 3 e 50 mg/mL apresentou eficiência no controle de *Salmonella*. Comparativamente, o óleo essencial encapsulado exibiu halo de inibição, mostrando atividade antimicrobiana. No teste de MIC para ambas as soluções, óleo encapsulado e ácido líquido, o MIC foi de 1:16, correspondendo a 3,12 mg/mL do agente antimicrobiano. No teste de sinergismo a interação de sinergismo foi confirmada na concentração de 1MIC e solução mais concentrada. A abordagem da sinergia entre os compostos, os resultados sugerem que a combinação do óleo essencial de *M. alternifolia* com os sais ácidos, potencializam a ação dos compostos, portanto tem um potencial significativo no controle da *Salmonella*.

Palavras-chave: Conservantes naturais; microencapsulação; Sanitizante; Óleo Essencial.

ABSTRACT

Because Salmonella is a bacterium of worldwide concern as it is the main cause of food-borne illnesses, it is necessary to control this microorganism. Animal feed has been identified as the biggest source of propagation of this bacterium, so alternatives to mitigate the pathogen throughout the production chain are important. Encapsulated organic acids, such as acetic acid and propionic acid, are already used in animal feed, but there have been reports of the bacteria becoming resistant to these compounds. Thus, the essential oil of *Melaleuca alternifolia* has antimicrobial properties against Salmonella, mainly due to its compound 4-terpineol. In this context, the aim of this study was to verify the synergistic action between *Melaleuca* oil and organic acids and their salts. The tests applied were sanitizing activity between encapsulated organic acid and liquid acid salts, such as sodium lactate and calcium propionate, where it was observed that the acid salts showed efficiency at all the concentrations tested, while the encapsulated organic acid did not show efficiency at any concentration. The diffusion well test showed that the encapsulated acid was ineffective in inhibiting bacterial growth at a concentration of 3mg; however, when the concentration was increased to 50mg, a halo was observed. The acid salt, at concentrations of 3 and 50 mg/mL, was effective in controlling Salmonella. In comparison, the encapsulated essential oil exhibited a halo of inhibition, showing antimicrobial activity. In the MIC test for both solutions, encapsulated oil and liquid acid, the MIC was 1:16, corresponding to 3,12 mg/mL of the antimicrobial agent. In the synergism test, the synergistic interaction was confirmed at a concentration of 1MIC and a more concentrated solution. In terms of the synergy between the compounds, the results suggest that the combination of *M. alternifolia* essential oil and the acid salts potentiates the action of the compounds and therefore has significant potential for controlling Salmonella.

Keywords: Natural preservatives; microencapsulation; Sanitizer; Essential oil.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVO GERAL	11
2.1 Objetivo Específico	11
3 ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÓLEO DE <i>Melaleuca alternifolia</i> NO CONTROLE DE <i>Salmonella</i>: AÇÃO EM SUPERFÍCIE E ESTUDO SINÉRGICO	12
3.1 <i>Salmonella sp</i> em Ração Animal	12
3.2 Ácidos Orgânicos no controle de <i>Salmonella sp</i>	14
3.2 Óleo Essencial de <i>Melaleuca alternifolia</i>	15
3.4 Microencapsulação de Óleo Essencial	17
3.5 Ação Sinérgica entre Compostos Antimicrobianos	18
4 MATERIAIS E MÉTODOS	19
4.1 Material em Estudo	19
4.2 Métodos	19
4.2.1 Teste de Atividade Anti- <i>Salmonella</i> em Superfície de Aço Inox	20
4.2.2 Microencapsulação por liofilização	21
4.2.2.1 Rendimento do Processo	24
4.2.3 Teste de atividade antimicrobiana por poço difusão	24
4.2.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	25
4.2.5 Teste de Sinergismo entre Óleo e Ácidos Orgânicos	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
6 CONCLUSÃO	35
REFERÊNCIAS	36

1 INTRODUÇÃO

Salmonella é uma bactéria de preocupação mundial em razão de ser a principal causadora de doenças transmitidas por alimentos e tratando-se de toda a cadeia produtiva ser suscetível a contaminação.

As ações do Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) visam reduzir a prevalência deste agente e estabelecer um nível adequado de proteção ao consumidor (BRASIL, 2016), pois de acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), não há garantia de que a carne de aves esteja completamente livre da presença de *Salmonella*. Ainda em conjunto com o Serviço de Inspeção Federal (SIF) e o Programa Nacional de Sanidade Avícola (PNSA), os investimentos em sanidade das aves, regulamentos e normativas, foram as principais ações que fizeram com que o Brasil seja o maior exportador da carne de frango no mundo (ABPA, 2022).

Em especial, tem-se a contaminação da ração animal, como sendo a maior fonte de propagação desta bactéria (MACIOROWSKI et al., 2006). Em vista disso, faz-se necessário o controle deste microrganismo na linha de produção de ração animal. Santos et al. (2006) e Ascenzi (2006) afirmam ser necessário alternativas para baixar níveis de microrganismos patogênicos ao longo da cadeia produtiva, devendo atuar de forma que afete a estrutura e metabolismo da bactéria.

A técnica de encapsulação de compostos permite o revestimento do princípio ativo com um agente encapsulante, visando conservar e estabilizar suas propriedades, além de ser possível a liberação do seu princípio ativo em momentos específicos (ZUIDAM; NEDOVIC, 2010; HALL et al. 2020). Conforme Grilli et al., (2007) já é de utilização na ração animal os ácidos orgânicos encapsulados no controle de *Salmonella*, particularmente os ácidos de cadeia curta.

O óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*, possui mais de 100 compostos, dentre eles o 4-terpineol, responsável por sua propriedade antimicrobiana, que possui como mecanismo de ação, a ruptura da membrana celular dos microrganismos. Devido seus compostos possuir alta volatilidade, Hall et al. (2020), indicam o processo de microencapsulamento para sua conservação, bem como de seus princípios ativos

2 OBJETIVO GERAL

Verificar a ação sinérgica entre óleo essencial de *M. alternifolia* microencapsulado e ácidos orgânicos e seus sais.

2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter microcápsulas de óleo essencial de *M. alternifolia* a partir de técnica de liofilização;
- Testar atividade antimicrobiana da microcápsula de óleo essencial de *M. alternifolia* frente a *Salmonella* por poço difusão;
- Testar atividade de ácidos orgânicos encapsulados e sais de ácidos orgânicos frente a *Salmonella* por poço difusão;
- Verificar atividade sanitizante de sais de ácidos orgânicos e ácido orgânico encapsulado em superfície de aço inox;
- Verificar a concentração inibitória mínima do óleo essencial de *M. alternifolia* microencapsulado, dos ácidos orgânicos e sais de ácidos orgânicos.

3 ÁCIDOS ORGÂNICOS E ÓLEO DE *Melaleuca alternifolia* NO CONTROLE DE *Salmonella*: AÇÃO EM SUPERFÍCIE E ESTUDO SINÉRGICO

Para fundamentar o projeto, bem como seus métodos, neste capítulo será apresentado o referencial teórico sobre o óleo essencial de *M. alternifolia*, seu produto encapsulado e sua propriedade antimicrobiana. Também será percorrido sobre a atividade antimicrobiana de ácidos orgânicos e a sinergia entre esses compostos.

3.1 *Salmonella* sp. EM RAÇÃO ANIMAL

Salmonella é uma bactéria bastonete Gram negativo, não esporogênico, anaeróbios facultativos e oxidases negativos. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS).

Conforme Silva, Junqueira e Silveira (2017), seu habitat natural é o trato intestinal de humanos e animais, porém toda a cadeia de produção de alimentos, da matéria prima ao produto final, pode ser atingida por *Salmonella*.

Cortez et al. (2006), afirma que embora que seja parte da flora natural de alguns animais como aves e suínos, algumas cepas são patogênicas para humanos e outros animais, causando a salmonelose. Essa doença é comumente transmitida por aves de corte, o que leva à contaminação de alimentos como carcaças de frango, aumentando os riscos para a saúde humana. Além disso, o uso extensivo de antibióticos em rações animais contribui para o surgimento de cepas resistentes de *Salmonella*, o que é particularmente preocupante devido ao risco de doenças transmitidas por alimentos.

Ainda no estudo de Cortez et al. (2006), diversos sorotipos como *enteritidis*, *kentucky*, *Enterica subsp. Enterica 8,20:-:z6*, entre outros, foram evidenciados em diversos ambiente de abate de aves, como na água de escalda, carcaça e penas. No estudo A maioria das amostras contaminadas por esses sorotipos apresentaram resistência a certos antibióticos, como ampicilina, tetraciclina, gentamicina, amoxicilina/ácido clavulânico e sulfazotrim.

O estudo dos autores Maciorowski et al. (2006), afirmam que a ração animal tem sido identificada como uma das principais fontes de contaminação alimentar. Conforme Stark et al. (2002), embora a contaminação da ração ser monitorada

quanto possíveis contaminações há muito tempo, ainda existe um risco significativo de presença de *Salmonella*.

Conforme Paredes et al. (2023), a segurança contaminação de ração é um desafio de importância não apenas para o animal, mas para a saúde humana também, pois a contaminação por *Salmonella*, trata-se de uma infecção por zoonoses, ou seja, transmissível para os seres humanos. Essa contaminação inicial do animal para o humano acontece partir da alimentação animal contaminada, se espalhando através cadeia alimentar, desde a produção primária até os consumidores em contato direto com animais colonizados e infectados.

Laboissière (2008), afirma que a presença de umidade é um dos principais fatores que propiciam a multiplicação da *Salmonella* em rações animais, porém com o tratamento térmico pelo qual o produto passa, ocasiona a eliminação do microrganismo em sua maioria.

Conforme a IN nº 34 de 2008, outras etapas do processo como o armazenamento, embalagem, estoque e distribuição, podem causar a recontaminação do produto, portanto, para prevenção e redução da contaminação do produto final, Rostagno et al. (2003), diz que os esforços, incluem o controle de boas práticas de fabricação (BPF), do recebimento da matéria-prima até o produto entrar em contato com os animais.

Ainda conforme a IN nº 34 de 2008, alguns dos controles de BPF incluem higienização e desinfecção de instalações e equipamentos e controles de processo e higienização dos manipuladores.

Para Ascenzi (2006), um controle preventivo efetivo da *Salmonella*, é necessário antisséptico e desinfetantes assertivos, onde o processo químico para remover microrganismos indesejados, afeta sua estrutura e metabolismo.

A crescente resistência microbiana aos antibióticos é frequentemente relacionada ao uso indiscriminado pela medicina humana, entretanto, também tem sido associada à forma como os alimentos são produzidos, podendo estar relacionada, entre outros fatores, ao emprego de substâncias químicas, como antibióticos, em rações animais, sendo proibida a presença dessas substâncias em carnes voltadas para a exportação. No Brasil, os compostos tetraciclina, penicilina, cloranfenicol, sulfonamidas sistêmicas, furazolidona, nitrofurazona e avorpacina têm o emprego proibido como aditivos para rações Cox e Pavic (2010) mostraram que alguns antibióticos podem facilitar a colonização, aumentar a excreção e prolongar a

disseminação de *Salmonella spp.* Desta forma, a proibição de diversos antibióticos na avicultura tem gerado a necessidade do desenvolvimento de novas formas de controle das infecções bacterianas.

Conforme Miltemburg (2000), aditivos alimentares e produtos que promovem exclusão competitiva têm sido propostos para garantir baixos níveis de microrganismos patogênicos ao longo da cadeia produtiva. Santos et al. (2006), afirma que dentre estes, os ácidos orgânicos são de interesse para contribuir no controle de *Salmonella sp.*

3.2 ÁCIDOS ORGÂNICOS NO CONTROLE DE *Salmonella sp.*

De acordo com Canibe et al., (2001), ácidos orgânicos são substâncias que contêm um ou mais grupos carboxila em suas moléculas, como ácidos graxos e aminoácidos. Podem estar disponíveis como sais de sódio, potássio e cálcio. A vantagem desses sais sobre os ácidos livres é que eles são inodoros e fáceis de usar na produção de alimentos, em especial ração animal. Vários ácidos orgânicos têm sido utilizados na como aditivos antimicrobianos na produção animal, sendo mais utilizado os ácidos de cadeia curta, como ácido acético, ácido propiônico e ácido butírico.

Canibe et al., (2001), afirmam que o efeito antimicrobiano de um ácido depende de sua constante de dissociação (pKa), que é proporcional à concentração do íon formado. Quanto maior o valor de pKa, apresentam maior concentração da forma não-ionizada. Freitas et al. (2006), confirma que os ácidos orgânicos têm ação antimicrobiana mais eficiente no estômago, devido atingirem um pKa maior de forma não dissociada, assim conforme Freschi (2014), podem atravessar membranas plasmáticas, liberar próton no interior da célula, se transformar para a forma dissociada e por consequência alterar o pH celular, concentração de prótons e a carga elétrica no ambiente extracelular. Ao reduzir o pH extracelular, enzimas digestivas intestinais irão auxiliar no desenvolvimento de microrganismos benéficos que irão competir com os microrganismos patógenos presentes, reduzindo os mesmos. Por fim, a presença dos ácidos internamente nas células bacterianas, aumenta a pressão osmótica por compensação de carga elétrica, levando a parede celular ao rompimento. Bactérias Gram negativas são mais sensíveis a ácidos com

menos de 8 átomos de carbono, tais como: ácido propiônico, ácido acético, ácido fórmico, etc.

Segundo Immerseel et al. (2002), a tecnologia de microencapsulação de ácidos também tem sido empregada como forma de estabilizar princípios ativos e possibilitar importantes ganhos de produtividade. Grilli et al. (2007), confirmam que esses ácidos atingem concentrações maiores e consistentes em relação aos ácidos não encapsulados. Vale a ressalva que conforme Marafon e Beltrame (2011), a utilização de ácidos orgânicos não gera resíduos nas carcaças, portanto sua utilização é segura.

Entretanto, Heres et al. (2004) e Dunkley et al. (2009), relatam o que os ácidos orgânicos têm contribuído com a resistência de cepas de *Salmonella spp.*, assim como os antibióticos.

3.3 ÓLEO ESSENCIAL DE *Melaleuca alternifolia*

Os óleos essenciais conforme exposto por Abed, et al. (2014), são compostos produzidos naturalmente pelas plantas, gerados por seu metabolismo secundário, podendo ser encontrados nas sementes, cascas, caules, raízes, flores, folhas e frutos. A produção desses compostos nas plantas está relacionada a presença de estruturas chamadas células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos e células epidérmicas que estão distribuídas de forma aleatória na planta.

Abed et al. (2014) ainda afirmam que os óleos essenciais têm sido usados principalmente, na indústria de alimentos, como aromatizantes e antimicrobianos naturais na preservação de alimentos.

De acordo com Carson, Hammer e Riley (2006), a planta *M. alternifolia*, também conhecida como “árvore do chá”, tem como principal derivado o óleo essencial de *M. alternifolia* ou “*tea tree oil*”. Esta possui mais de 100 componentes químicos, dentre eles tem-se, hidrocarbonetos terpênicos, especialmente monoterpenos, sesquiterpenos e seus álcoois associados.

Silva (2001) levantou estudos sobre a *M. alternifolia* e seu óleo essencial cultivado e produzido no Brasil, o qual apresentou atividade antimicrobiana e composição iguais ao de origem Australiana.

Ainda no estudo dos autores Carson, Hammer e Riley (2006), a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. alternifolia*, apresentou ser 11 vezes maior

que o fenol. A partir de então a extração e utilização do óleo ficou mais comum, bem como progressão de pesquisas em cima do mesmo.

Conforme Jesus, Ellensohn e Barim (2005) a composição do óleo essencial de *M. alternifolia* foi padronizada pela ISO 4730 (2007) onde é estabelecido 3 quimiotipos (QT) de acordo com seus critérios físicos e químicos, sendo que o QT 1 possui alto teor de 4-terpineol.

Conforme estudo de Carson, Hammer e Riley (2006), o 4-terpineol é um dos principais compostos responsáveis pela propriedade antimicrobiana do óleo essencial de *M. alternifolia*, portanto, para garantia da efetividade antimicrobiana há o limite inferior de 30% de 4-terpineol em sua composição, segundo padrão estabelecido pela ISO 4730.

Juntamente ao 4-terpineol, responsável pela atividade antimicrobiana, Silva (2001), relata também os compostos 1,8-cineol, α -terpineno, γ -terpineno, α -pineno, β -pineno, α -terpineol, p-cimeno que permitem um amplo espectro de ação antimicrobiana, desde bactérias Gram positivas quanto as Gram negativas, além de alta atividade antifúngica. Na tabela 1 observa-se os componentes do óleo essencial de *M. alternifolia*.

Tabela 1 – Composição do Óleo de *M. alternifolia*

COMPONENTES	COMPOSIÇÃO (%)	
	ISO 4730	Composição típica
Terpinen-4-ol	≥ 30	40, 1
γ -terpineno	10 – 28	23, 0
α -terpineno	5 – 13	10, 4
1,8-cineol	≤ 15	5, 1
Terpinoleno	1, 5 – 5	3, 1
p-cimeno	0,5 – 12	2, 9
α -pineno	1 – 6	2, 6
α -terpineol	1,5 – 8	2, 4
Aromadendreno	Traços	1, 5
δ -cadineno	Traços	1, 3
Limoneno	0, 5 – 4	1, 0
Sabianeno	Traços	0, 2
Globulol	Traços	0, 2
Viridiflorol	Traços	0, 1

Fonte: Carson, Hammer e Riley, 2006.

Há vários estudos que comprovam a atividade antimicrobiana de óleo essencial de *M. alternifolia*, em especial contra bactérias Gram-negativas, Nikolic et al. (2012) e Penteado *et al.* (2021) realizaram investigações com diversas bactérias, dentre elas a *Salmonella typhimurium*, verificando a ação inibitória contra mesma.

Estudos de Trombetta et al. (2005), afirma que os compostos do óleo essencial de *M. alternifolia*, acarreta em um aumento da permeabilidade e fluidez da membrana que induzem na respiração e nos processos de transporte de íons as bactérias. Enquanto Burt (2004), mostra que o mecanismo de ação do óleo essencial ocorre a partir da ruptura da membrana celular dos microrganismos.

3.4 MICROENCAPSULAÇÃO DE ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *M. alternifolia*, apresenta alta volatilidade (SIMÕES et al. 2002), sendo relatado a sensibilidade a condições ambientes, portanto a exposição do óleo ao oxigênio, luz, umidade e calor, podem levá-lo a oxidação e degradação, e conseqüentemente alterar sua composição (Nori et, al. 2013).

Dessa forma, Hall et al (2020), sugerem que para conservação de suas propriedades e composição, bem como, a preservação da sua estabilidade, uma alternativa viável é a técnica de microencapsulação, a partir da utilização um agente encapsulante resistente a estas condições e com afinidade química às propriedades do óleo.

Conforme, Zuidam e Nedovic (2010) a técnica de microencapsulação pode ser definida como um processo que permite o revestimento de substâncias com um filme protetor, também chamado de agente encapsulante, que além de preservar as propriedades, se desfazem sob estímulo específico, o que pode ser associado a liberação do princípio ativo no momento adequado.

Hall et al. (2020) também comprova em seus estudos que o mesmo comportamento dos óleos puros frente as atividades antimicrobianas, são as mesmas nas microcápsulas, portanto o processo de microencapsulação não interfere nas capacidades e propriedades do óleo.

3.5 AÇÃO SINÉRGICA ENTRE COMPOSTOS ANTIMICROBIANOS

Conforme Oliveira et al (2021), os óleos essenciais por possuírem muitas substâncias com propriedades ativas antimicrobianas, podem ser uma tendência promissora para uso como antibióticos naturais, devido possuírem uma composição química complexa, dificulta a criação de resistência para as bactérias.

A resistência de bactérias a antimicrobianos, segundo Ascioğlu et al. (2014), tem como principal causa o uso indiscriminado de antibióticos, dessa forma, Langeveld, Veldhuizen e Burt (2014), relatam que a combinação de compostos naturais como óleo essenciais, com outros compostos antimicrobianos, podem ser uma nova estratégia para combater o contínuo aumento de cepas bacterianas resistentes a antibióticos.

Aiyegoro (2011), relata que há diversos estudos que comprovam a capacidade de substâncias naturais, interagir sinergicamente com compostos sem atividade antimicrobiana, sensibilizando bactérias que eram resistentes a esses compostos.

Láscaris et al. (2022), apresentou um estudo de sinergismo entre óleos essenciais e conservantes sintéticos, obtendo como resultado a evidência de sinergismo na associação de diversos óleos essenciais com sorbato de potássio, benzoato de sódio e metabissulfito de sódio para *Salmonella enteritidis* e *Salmonella typhimurium* (Tabela 1).

Tabela 2 - Sinergismo entre os óleos essenciais com os conservantes sintéticos

Bactérias	Óleos														
	Alecrim			Manjerição			Tangerina			Hortelã-Pimenta			Copaíba		
	MS	SP	BS	MS	SP	BS	MS	SP	BS	MS	SP	BS	MS	SP	BS
<i>S. Typhimurium</i>	-	S	S	A	S	S	-	A	S	S	S	S	S	-	S
<i>S. Enteritidis</i>	A	S	S	S	A	S	S	S	S	S	S	A	S	S	A

Legenda: MS=Metabissulfito de Sódio; SP= Sorbato de Potássio; BS= Benzoato de Sódio; S= Sinergismo; A= Ação aditiva; -= Indiferente; X= Antagônico. Fonte: Adaptado de Láscaris et al. 2022.

4 MATERIAIS E MÉTODOS OU METODOLOGIA

Neste capítulo será abordado sobre os procedimentos metodológicos utilizados para execução do projeto, bem como os recursos necessários.

4.1 MATERIAL EM ESTUDO

O óleo essencial de *M. alternifolia* e a maltodextrina foram adquiridos no comércio local.

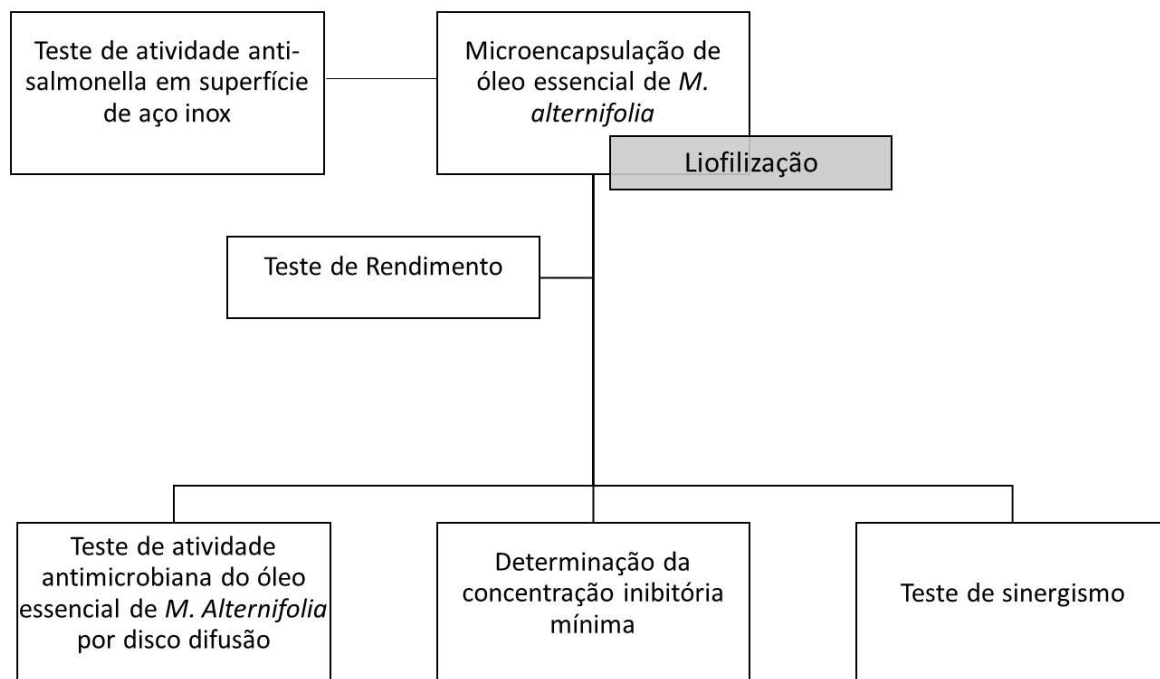
O ácido orgânico encapsulado apresentado na forma de pó e o sal de ácido orgânico apresentado na forma líquida, foram obtidos por doação de uma agroindústria localizada na cidade de Cambé-PR. O produto encapsulado é composto por ácido fórmico, ácido propanoico e ácido acético, sendo utilizado na ração animal e como sanitizante. O sal de ácido líquido é composto por lactato de sódio e propionato de cálcio, sendo também utilizado na ração e sanitização. A forma de utilização e as quantidades seguiu indicação da ficha técnica e do técnico do produto e do técnico da empresa.

Os isolados bacterianos testados foram *Salmonella typhimurium* ATCC 24028 e *Salmonella sp* isolada de alimentos, ambos estocados em caldo Brain Heart Infusion (BHI-Himedia) com 20% de glicerol e armazenados em freezer no laboratório de Microbiologia Básica e Aplicada (LAmBA) da UTFPR.

4.2 MÉTODOS

Neste capítulo será apresentado como foi a execução dos procedimentos experimentais, como metodologias de análises aplicadas. Os experimentos do projeto foram realizados nas instalações da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, campus Londrina, contemplando as seguintes etapas conforme Figura 1.

Figura 1 - Esquema Procedimentos Experimentais



Fonte: autoria própria

4.2.1 Teste de Atividade Anti-Salmonella em Superfície de Aço Inox

A ação sanitizante dos compostos ácidos pó e líquido foram testados quanto a atividade anti-*Salmonella*, em superfície de aço inox. Inicialmente, foi realizada a limpeza da superfície com álcool 70%, água estéril e seguido de exposição por 15 minutos em luz UV. Posteriormente, a superfície foi demarcada com quadrados de 4x4cm, totalizando 24 quadrantes, conforme esquematizado na figura 2.

Cada quadrante correspondeu a um controle positivo, contendo uma cultura de bactéria, controle negativo, sem bactéria e sem composto químico, e os demais contendo bactéria + composto químico nas diluições descritas na Figura 2. O ácido em encapsulado não sofreu diluições, sendo utilizado sempre uma amostra pura.

Com o auxílio de um suabe, foi semeado nos quadrados pré-determinados, uma cultura de *Salmonella Typhimurium* e *Salmonella* isolada de alimentos, na concentração de 1×10^5 UFC/mL, e aguardado a secagem. Na sequência, 1 mL de cada diluição do ácido líquido e 1 g de pó foram depositados nos respectivos

quadrados. Após 20 segundos de contato, o material foi removido com gaze umedecida em água estéril, e seca com gaze estéril. Após esse processo, um suabe umedecido em água estéril foi friccionado em várias direções do quadrante e semeado em ágar BHI. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas e o resultado se deu pelo crescimento ou não da bactéria.

Figura 2 - Teste de Atividade Anti-Salmonella em Superfície de Aço Inox

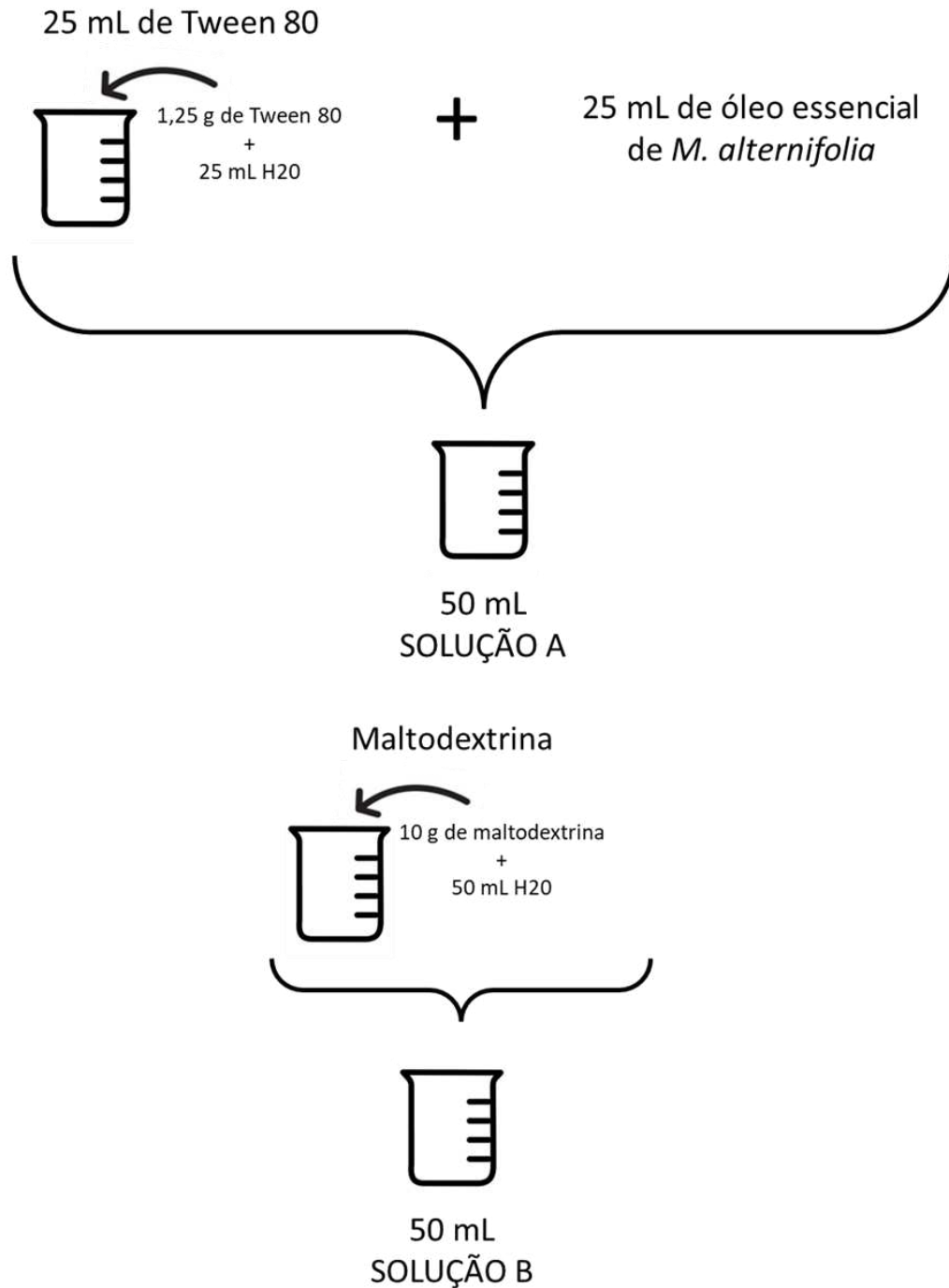
	PURO		50%		25%	
<i>Salmonella typhimurium</i>	Controle positivo	Controle negativo	Controle positivo	Controle negativo	Controle positivo	Controle negativo
	Ác orgânico encapsulado	Ác orgânico líquido	Ác orgânico encapsulado	Ác orgânico líquido	Ác orgânico encapsulado	Ác orgânico líquido
<i>Salmonella</i> isolada de alimento	Controle positivo	Controle negativo	Controle positivo	Controle negativo	Controle positivo	Controle negativo
	Ác orgânico encapsulado	Ác orgânico líquido	Ác orgânico encapsulado	Ác orgânico líquido	Ác orgânico encapsulado	Ác orgânico líquido

Fonte: autoria própria

4.2.2 Microencapsulação por liofilização

Para realizar a microencapsulação do óleo essencial de *M. alternifolia* primeiramente foi feito o preparo de duas soluções, na solução A, continha óleo essencial de *M. alternifolia* e solução B que continha solução de maltodextrina, nas concentrações especificadas na figura 3.

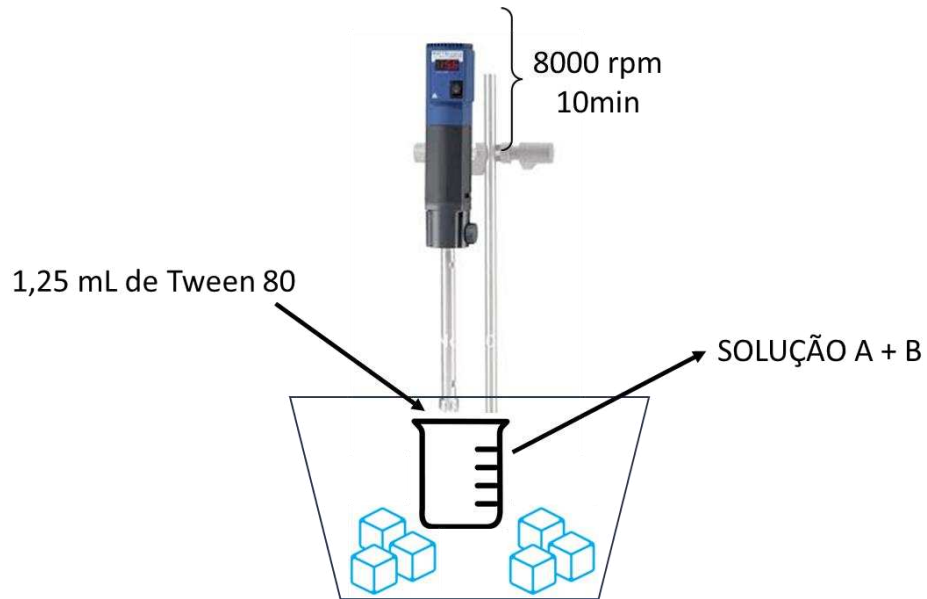
Figura 3 Preparo das soluções para emulsão e ser liofilizada



Fonte: autoria própria

Ambas soluções foram emulsionadas no equipamento ultra-turrax T25, em 8.000 rpm por 10 minutos, em banho de gelo para controle da temperatura, durante o processo foi adicionado aos poucos 1,25 mL de Tween 80 para auxílio na emulsão (Figura 3).

Figura 4 - Processo de Emulsão das Soluções A e B



Fonte: autoria própria

A emulsão foi distribuída em placas de Petri, previamente pesadas e identificadas e foram congeladas por 24 horas, e levadas ao processo de liofilização por 24 h. O pó obtido foi mantido sob refrigeração.

4.2.2.1 Rendimento do Processo

O rendimento do processo ($\eta\%$), compreende a quantidade em massa de material recolhido após a liofilização, com referência à massa da solução utilizada no preparo (XIAO et al., 2011). Para tanto, foi utilizada a equação de rendimento (Figura 5).

Figura 5 - Equação de rendimento do processo de liofilização

$$\eta(\%) = \frac{\text{massa de material seco coletado}}{\text{massa (encapsulante + óleo) na alimetação}} \times 100 \quad (1)$$

Fonte: XIAO et al., 2011

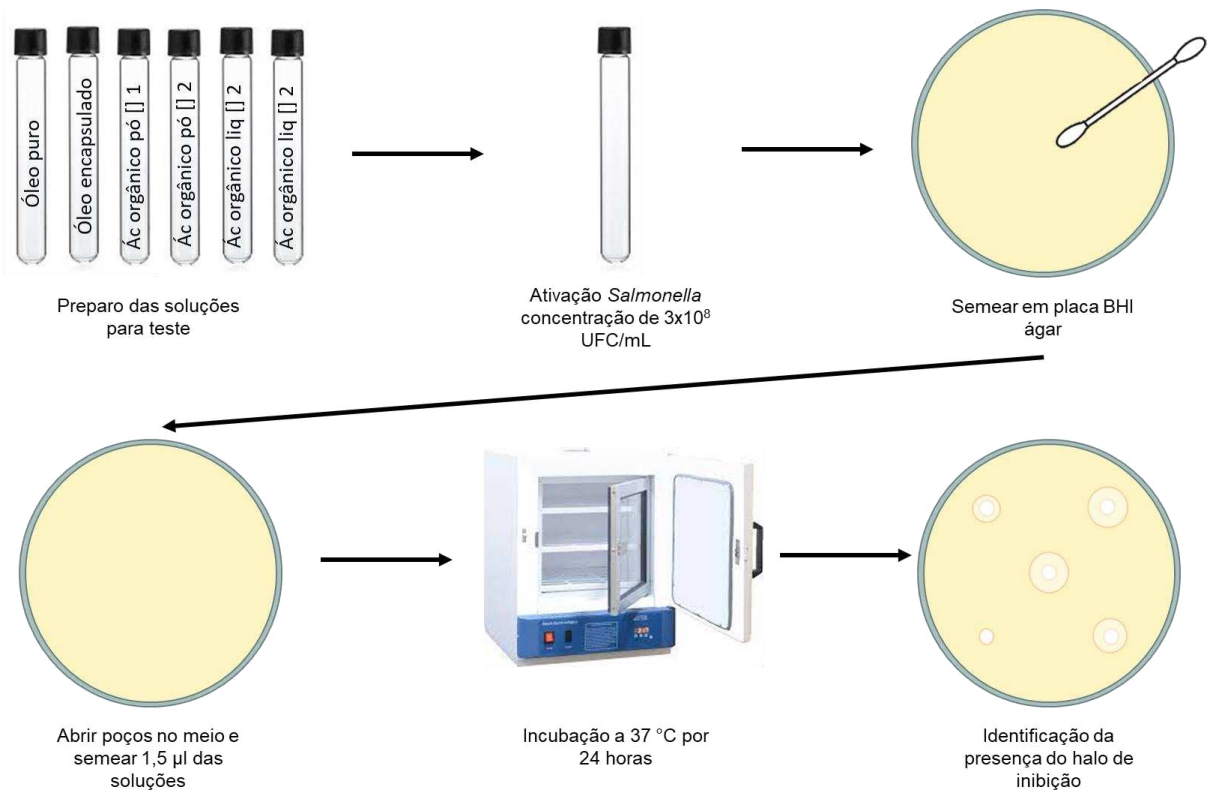
As placas foram previamente pesadas e identificadas antes de verter a emulsão e após o processo de liofilização as microcápsulas foram pesadas e feito o cálculo da equação.

4.2.3 Teste de atividade antimicrobiana por poço difusão

Para determinação e comparação da atividade antimicrobiana das microcápsulas de óleo essencial de *M. alternifolia* e ácidos orgânicos encapsulados, foi utilizada a técnica de poço difusão. Uma solução de cada material encapsulado foi preparada em água destilada estéril, na mesma concentração utilizada pelo composto químico e em concentração equivalente ao óleo encapsulado, sendo 50 mg/mL de óleo encapsulado, 50 e 3 mg/mL de cada composto ácido.

Em meio de cultura BHI ágar foi semeado a *Salmonella* na concentração de $3,0 \times 10^8$ UFC/mL (tubo 1 escala McFarland). Posteriormente, foram feitos 5 poços no ágar, em que foram depositados 30 μ l de cada solução testada (Figura 6). As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas, o efeito antimicrobiano foi observado pela presença do halo de inibição.

Figura 6 - Teste de atividade antimicrobiana por poço difusão



Fonte: autoria própria

4.2.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

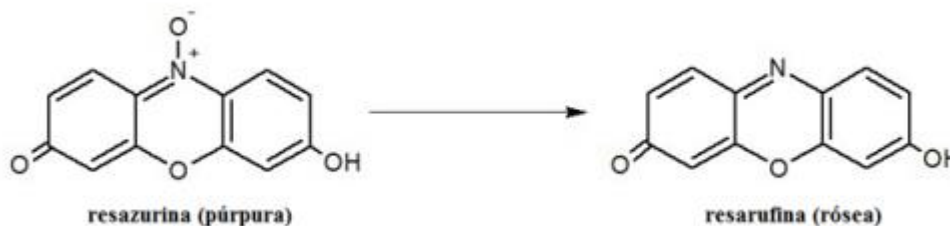
Para determinação da concentração inibitória mínima, foi utilizado a técnica de diluição em caldo, considerando a relação entre a proporção de crescimento da bactéria no meio líquido e a concentração dos ativos utilizados, no caso, óleo essencial de *M. alternifolia* microencapsulado e ácidos orgânicos líquido. Neste teste foi utilizado apenas *S. typhimurium* e o ácido líquido na concentração de 50 mg/mL.

Os poços de placa de microintitulação (96 poços) foram preenchidos com 100µL de caldo BHI e 100µL do material microencapsulado e realizada a diluição seriada de 1:2. Posteriormente, foram distribuídos 10µL da suspensão bacteriana em cada orifício das microplacas. As placas foram incubadas a 37°C por 24 h. Após este período, o crescimento bacteriano foi revelado com resazurina (0,001 %). As placas foram incubadas por 2 horas.

A resazurina (7-hidroxi-3H-phenoxazin-3-ona10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meios de cultura. O

mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura-inibição de crescimento) em resarufina (cor rósea-crescimento bacteriano), mostrado na Figura 7. A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células microbianas (O'BRIEN et al., 2000).

Figura 7 - Mecanismo indicador resazurina



Fonte: Palomino et al., 2002.

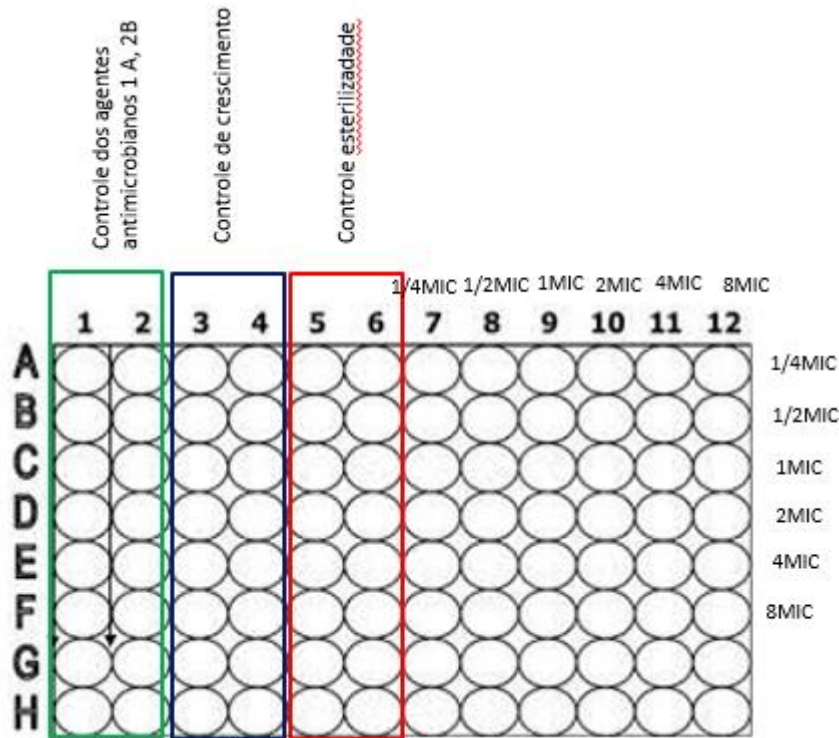
4.2.5 Teste de Sinergismo entre Óleo e Ácidos Orgânicos

Em uma placa de microtitulação (96 poços) foi adicionado 100 µL de caldo BHI em todos os poços. Posteriormente, nas linhas A a F foi adicionado 100 µL do óleo essencial de *M. alterfolia*, na concentração de ¼ a 8x o valor do MIC. Nas colunas 7 a 12 foi adicionado 100 µL de ácido orgânico, na concentração de ¼ a 8x o valor da CIM. Nos poços 1 a 6 e A a H foram utilizados para o teste de esterilidade, controle de crescimento e controle dos agentes químicos (Figura 8).

Em cada poço foi adicionada 10 µL da suspensão bacteriana padronizada a $1,0 \times 10^7$ UFC/mL, com exceção dos poços referente ao controle de esterilidade.

As placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, e a leitura de crescimento foi revelada com resazurina.

Figura 8 - Teste de Sinergismo entre Óleo e Ácidos Orgânicos



Fonte: autoria própria

Os resultados foram interpretados de acordo com o índice de concentração inibitória fracionada (FICI), determinado da seguinte equação:

CIF do óleo: CIM do óleo combinado / CIM do óleo sozinho

CIF do ácido: CIMB do ácido combinado / CIM do ácido sozinho

O valor do índice FICI, representada pela somatória de CIFA e CIFB, foi usado para categorizar a interação dos dois compostos testados conforme Tabela 2 (LEE; JANG; CHA, 2012).

Tabela 3 - Valores de FICI correspondentes às diferentes interações

Interação	FICI
Sinérgica	$FICI \leq 0,5$
Aditiva ou sinergismo parcial	$0,5 < FICI \leq 1$
Indiferente	$1,1 < FICI \leq 2$
Antagônica	$FICI > 2$

Legenda. FICI: Índice de concentração inibitória fracionada; CIF: concentração inibitória fracionada.
Fonte: LEE; JANG; CHA, 2012.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste item iremos apresentar os resultados obtidos neste estudo.

5.1 Teste de Atividade Anti-*Salmonella* em Superfície de Aço Inox

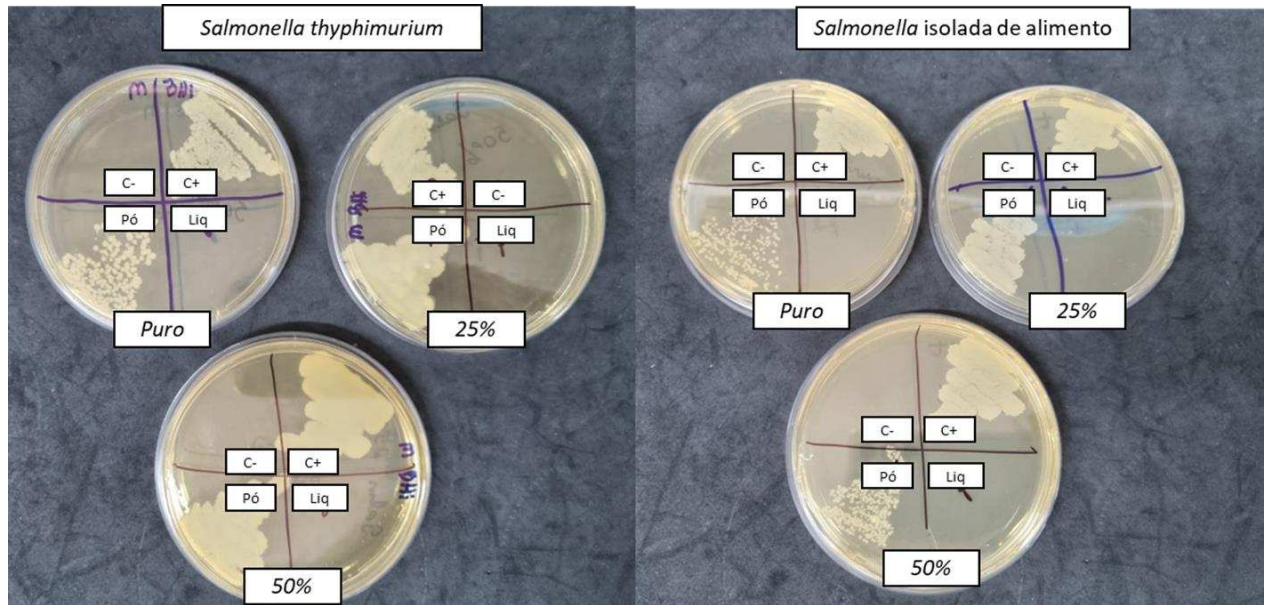
O desempenho dos ácidos orgânicos encapsulado e sais de ácidos líquido, em diferentes diluições estão apresentados na Figura 9. Observou-se ausência de crescimento bacteriano no quadrante controle negativo (C-), que se referiu a limpeza da superfície, indicando que o procedimento de sanitização antes do teste foi eficiente. Já o controle positivo (C+) correspondente a presença da bactéria sem agente químico, mostrou crescimento celular, indicando que o microrganismo estava presente mesmo após a limpeza realizada após o inóculo.

Observa-se também que o sal de ácido mostrou eficiência nas concentrações testadas para ambas bactérias, mostrando que não há necessidade de utilizar o composto puro, mesmo em um curto período de tempo (20 seg). Em contramão, o ácido em pó não mostrou eficiência no controle de *Salmonella*, nas condições testadas.

Essa observação sugere que a forma encapsulada dos ácidos orgânicos pode não ter exercido a ação desejada frente a *Salmonella* na superfície de aço inoxidável, por possivelmente não ter se dissociado e liberado o composto ativo da microcápsula, indicando a necessidade de reavaliação ou ajustes na formulação ou método de aplicação.

Por outro lado, o sal de ácido demonstrou eficiência em todas as diluições testada frente aos dois isolados, *Salmonella typhimurium* e *Salmonella* isolada de alimentos. Este resultado positivo sugere que, na forma líquida, o ácido orgânico foi capaz de exercer uma ação inibitória consistente contra a *Salmonella*, mesmo em diferentes níveis de diluição, até mesmo em 25%. Esta eficácia pode ser atribuída à rápida liberação e contato direto do ácido na forma líquida com as bactérias, proporcionando uma resposta antimicrobiana eficaz.

Figura 9 - Crescimento bacteriano após tratamento de sanitização de superfície de aço inox com diferentes concentrações de ácido líquido e pó



Fonte: autoria própria.

Estes resultados, além de contribuírem para a compreensão da eficácia antimicrobiana desses compostos, oferecem informações importantes para otimizar métodos de controle de *Salmonella* em ambientes específicos, como em superfícies.

5.2 Microencapsulação por liofilização e rendimento do Processo

O processo de microencapsulação por liofilização demonstrou resultados satisfatórios, indicando uma efetiva formação de microcápsulas contendo óleo essencial de *M. alternifolia* (Figura 10). O rendimento do processo foi calculado com base na massa recolhida após a liofilização. Após a pesagem da matéria seca (liofilizada) o rendimento foi calculado e o valor aproximado foi de aproximadamente 42%.

Figura 10 - Aspecto do óleo de *Melaleuca alternifolia* encapsulada após processo de liofilização



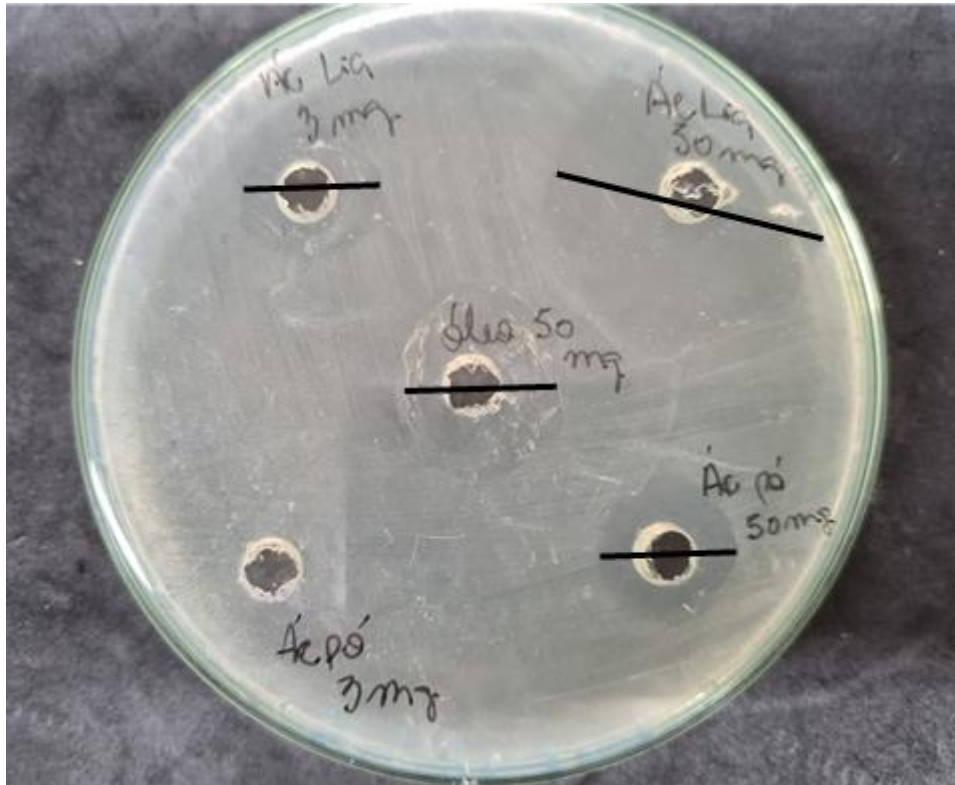
Fonte: autoria própria.

5.3 Teste de atividade antimicrobiana por poço difusão

O teste de atividade antimicrobiana por poço difusão evidenciou diferenças na eficácia dos compostos testados frente a *S. typhimurium*. Ao avaliar o ácido orgânico encapsulado na concentração de 3mg/mL não apresentou halo de inibição, indicando ausência de eficácia na inibição do crescimento bacteriano. No entanto, com a concentração elevada para 50mg, observamos a formação de um halo de tamanho menor quando comparado ao sal de ácido. Já o ácido líquido nas concentrações 3 e 50 mg/mL apresentou eficiência no controle de *Salmonella*, sendo o halo de inibição proporcional à concentração testada. Comparativamente, o óleo essencial encapsulado exibiu halo de inibição, mostrando atividade antimicrobiana (Figura 11).

A partir desses resultados, selecionou o uso somente do sal de ácido na concentração de 50 mg/mL (maior eficiência) para os testes de MIC e sinergismo. Como o ácido pó apresentou baixa eficiência no teste de poço difusão, não demos continuidade nos demais testes.

Figura 11 - Halo de inibição das concentrações de ácido líquido, ácido pó e óleo de *Melaleuca alternifolia* encapsulada

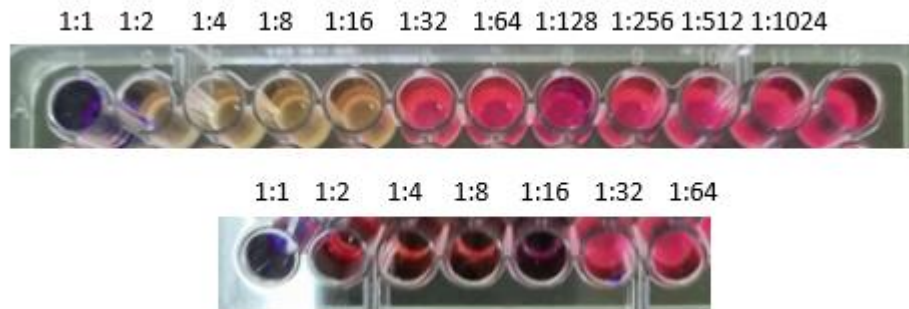


Fonte: autoria própria.

5.4 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Os resultados da CIM para o ácido e o óleo estão apresentados na Figura 12. Para ambas soluções, óleo encapsulado e ácido líquido, o MIC foi de 1:16, correspondendo a 3,12 mg/mL do agente antimicrobiano. A resazurina reagiu com o ácido apresentando uma coloração amarelada, se referindo a ausência de crescimento bacteriano. Já quando o microrganismo estava ativo, a coloração do poço ficou na cor rosa, indicando a concentração mínima de agente químico que inibiu a bactéria.

Figura 12 - Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido líquido (figura superior) e óleo de *Melaleuca alternifolia* (figura inferior)



Fonte: autoria própria.

5.5 Teste de Sinergismos entre Óleo e Ácidos Orgânicos

A concentração inibitória fracional (FICI) dos agentes antimicrobianos e sua interação estão expressos na Tabela 4. Os resultados revelam que não houve interação de sinergismo na concentração de 1/2MIC, para ácido líquido e óleo; a interação de sinergismo foi confirmada na concentração de 1MIC e solução mais concentrada.

A combinação de óleo e ácido e sua possível interação sinérgica facilitam seu uso como conservantes naturais de alimentos, aumentando seu espectro de ação, uma vez que esse tipo de interação indica a redução dos compostos antimicrobianos testados. Estes dados revelam que a combinação de óleo e ácido combinados tem eficiência antimicrobiana frente a *Salmonella*.

Tabela 4 - Concentração inibitória mínima (mg/mL) e índice de concentração inibitória fracional (FICI) do óleo de *Melaleuca alternifolia* e ácido orgânico frente ao isolado de *Salmonella typhimurium*

Substância teste	CIM (mg/mL)		CIF	FICI	Efeito
	Isolados	Combinados			
Óleo	3,12	0,78	0,25	0,5	sinergismo
Ácido líquido	3,12	0,78	0,25	0,5	sinergismo

Legenda: CIM: Concentração Inibitória Mínima; FICI: Índice de Concentração Inibitória Fracionada
 Fonte: Autoria própria

O setor de avicultura vem apresentando crescimento a cada ano, e os desafios para acompanhar as mudanças de mercado tem impulsionado as pesquisas para utilização de agentes naturais e atualizados a fim de garantir um alimento seguro aos consumidores.

Processos de conservação utilizando aditivos químicos tradicionais são usados há muitas décadas, entretanto, a utilização destes conservantes sintéticos vem sendo associados a ao isolamento de bactérias resistentes, podendo causar danos à saúde do consumidor (ABDELHAMID; EL-DOUGGDOUG, 2020). A própria ficha técnica dos ácidos utilizados neste estudo indica os perigos referentes ao manuseio desses produtos, incluindo inalação de vapores e irritação de pele e mucosa.

Embora os ácidos orgânicos, como métodos acéticos, lácticos e cítricos, têm sido amplamente utilizados no controle microbiológico de alimentos e sejam bastante eficazes, não são aplicáveis a todos os alimentos e apresentam desvantagens intrínsecas (alteração das propriedades sensoriais, toxicidade, etc.) (Puligundla e Lim, 2022).

Neste contexto, agentes de biocontrole, compostos naturais derivados de plantas, têm sido utilizados contra diversas bactérias veiculadas por alimentos, revelando sucesso com esses agentes antimicrobianos. Os critérios primários para a escolha de um agente de biocontrole incluem alta atividade antagônica contra o patógeno, seguro para consumo humano e não deve alterar as propriedades nutricionais e organolépticas dos produtos alimentícios (Chauhan et al., 2020).

Os óleos essenciais de plantas são compostos aromáticos voláteis extraídos de diversas partes do vegetal, tais como: botões e flores, sementes, folhas, cascas, frutas e raízes (NEGI, 2012). Normalmente a composição são terpenos e seus derivados oxigenados, como álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, éteres e ésteres (FORNARI et al., 2012). Muitos estudos vêm sendo realizado em relação ao uso de óleos essenciais para controlar microrganismos potencialmente patogênicos e deteriorantes em alimentos (SILVESTRE et al., 2019).

A microencapsulação de óleos essenciais tem por objetivo proteger os compostos bioativos, fornecer uma liberação controlada, minimizar o sabor e odor do óleo, entre outras. Portanto, estas vantagens tornam-se interessantes para as indústrias de alimentos, farmacêuticas, cosméticas, etc. (TIMILSENA; HAQUE; ADHIKARI, 2020).

Somado a isso, ações sinérgicas entre compostos antimicrobianos é uma boa estratégia para diminuir a quantidade de compostos utilizados.

6 CONCLUSÃO

O estudo buscou abordar uma bactéria de significativa relevância para o setor de alimentos, bem como alternativas para sua inibição. Dessa forma, foi possível evidenciar a eficácia do óleo essencial de *M. alternifolia* encapsulado na inibição da *Salmonella*, demonstrando ser uma alternativa viável no controle do patógeno.

Os ácidos orgânicos apresentam diferenças entre si em suas eficiências, enquanto o ácido orgânico encapsulado apresentou baixa eficácia, o sal de ácido apresentou eficácia consistente e alta atividade antimicrobiana. Esse resultado pode estar relacionado com capacidade de dispersão, interação e liberação do composto ativo frente a bactéria.

A abordagem da sinergia entre os compostos, os resultados sugerem que a combinação do óleo essencial de *M. alternifolia* com o ácido orgânico líquido, potencializam a ação dos compostos, portanto tem um potencial significativo no controle da *Salmonella*.

Cabe destacar que este estudo contribui para a comunidade acadêmica, gerando diferentes perspectivas sobre o assunto. No entanto, novas pesquisas devem ser feitas para explorar e ampliar os resultados obtidos.

REFERÊNCIAS

- ABDELHAMID, A. G.; EL-DOUGGDOUG, N. K. Controlling Foodborne Pathogens with Natural Antimicrobials by Biological Control and Antivirulence Strategies. **Heliyon**, v. 6, 2020.
- ABED, N. El; et al.. Chemical Composition, Antioxidant and Antimicrobial Activities of *Thymus capitata* Essential Oil with Its Preservative Effect Against *Listeria monocytogenes* Inoculated in Minced Beef Meat. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1–11, 2014.
- AIYEGORO, O.; et al.. Interactions of Antibiotics and Methanolic Crude Extracts of *Azelia Africana* (Smith.) Against Drug Resistance Bacterial Isolates. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 7, p. 4477–4487, 2011.
- ASCENZI, J.M. Handbook of Disinfectants and Antiseptics. **M. Dekker**, p. 137-143, Nova York, 2006. (CONFIRMAR)
- ASCIOGLU, S.; SAMORE, M. H.; LIPSITCH, M. A New Approach to the Analisis of Antibiotic Resistance Data from Hospitals. **Microbial Drug Resistance**, v. 20, n. 6, p. 583–590, 2014.
- BURT, S. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods: A Review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 3, n. 94, p. 233–253, 2004.
- CANIBE, N.; et al.. Effect of K-diformate to Starter Piglet Diets on Digesta and Faecal Microbial Profile, and on Stomach Alterations. **Journal of Animal Science**, v.79, p.2123–2133, 2001.
- CARSON, C. F.; HAMMER, K. A.; RILEY, T. V. *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree Oil); A Review of Antimicrobial and Other Medicinal Properties. **Clinical Microbiology Reviews**, v 19, n. 1, p. 50–62, 2006.
- CORTEZ, A. L. L.; et al.. Identification of *Salmonella* spp. isolates from chicken abattoirs by multiplex-PCR. **Veterinary Science**, v. 81, n. 3, 2006.
- COX, J. M.; PAVIC, A. Advances in enteropathogen control in poultry production. **Journal of Applied Microbiology**, v. 108, n. 3, 2010.
- CHAURAN, R.; et al.. Trending Biocontrol Strategies against *Cronobacter sakazakii*: A Recent Updated Review. **Food Research International**, v. 137, p. 109385, 2020.
- DUNKLEY, KD.; et al.. Foodborne *Salmonella* Ecology in the Avian Gastrointestinal Tract. **Anaerobe**, London, v. 15, n. 1, p. 26–35, 2009.
- FORNARI, T.; et al.. Isolation of Essential Oil from Different Plants and Herbs by Supercritical Fluid Extraction. **Journal of Chromatography**, v. 1250, p. 34, 2012.

FREITAS, L.S.; et al.. Avaliação de ácidos orgânicos em dietas para leitões de 21 a 49 anos de idade. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 4, p. 1711–1719, 2006.

FRESCHI, J. B. **Ácidos orgânicos isolados ou associados em dietas de frangos de corte**. 2014. 57f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal Paulista, Faculdade de Engenharia de Ilha Solteira, Ilha Solteira, 2014.

GRILLI E.; et al.. Microencapsulation Allows Release of Organic Acids in the GI Tract of Broilers. Proceedings of the 16th **European Symposium on Poultry Nutrition**, p.118. August 26 - 30, Strasbourg , France. 2007.

HALL, M. C.; et al.. Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Óleos Essenciais Nerol e Melaleuca Puros e Microencapsulados. **Brazilian Journal of Health Review**, Curitiba, v. 3, n. 3, p. 5331–5345, 2020.

HERES, L.; et al.. Effect of Acidified Feed on Susceptibility of Broiler Chickens to Intestinal Infection by *Campylobacter* and *Salmonella*. **Vet. Microbiol.**, Amsterdam, v. 99, n. 3, p. 259–267, 2004.

IMMERSEEL, F. Van; et al.. Feed Additives to Control *Salmonella* in Poultry. **World's Poultry Science Journal**. v. 58, p. 501–513, 2002.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. **Essential oils — Oil of Melaleuca, terpinen-4-ol type (Tea Tree oil) (ISO 4730:2017)**. 3rd ed. Geneva, 2017.

JESUS, E. R. de; ELLENZOHN, R. M.; BARIN, C. S. Óleo essencial de *Melaleuca alternifolia*: Otimização do Método Analítico. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 8, n. 2, p. 133–137, 2005.

LABOISSIÈRE, M. **Farinhas de resíduos de abatedouros avícolas em diferentes graus de processamento em rações pré-iniciais e iniciais de frangos de corte**. 2008. 88f. Dissertação (Mestrado) – Programa De Pós-Graduação Em Ciência Animal, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

LANGEVELD, W. T.; VELDHUIZEN, E. J. A.; BURT, S. A. Synergy Between Essential Oil Components and Antibiotics: A Review. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76–94, 2014.

LÁSCARIS, M. P. S.; Sinergismo microbiano entre óleos essenciais e conservantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos. **Research, Society and Development**. v. 11, n. 3, p. e32011326535, 2022.

LEE, Y. S.; JANG, K. A.; CHA, J. D. Synergistic Antibacterial Effect Between Silibinin and Antibiotics in Oral Bacteria. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, p.1–7, 2012.

MACIOROWSKI, G.K.; HERRERA, P.; JONES, F.T.; PHILLAI, S.D.; RICKE, S.C. Cultural and immunological detection methods for *Salmonella* spp. In animal feeds – a review. **Veterinary research communication**, v.30, p.127–137, 2006.

MARAFON, F; BELTRAME, JAM. **Ácidos Orgânicos como Aditivos Nutricionais para Ruminantes**. 2011. 21f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização) - Curso de Pós-graduação Lato Sensu em Produção de Bovinos de Corte, Faculdade de Ciências Biológicas e de Saúde da Universidade Tuiuti do Paraná, Guarapuava, 2011.

MILTEMBURG, G. Promotores e Aditivos de Crescimento em Avicultura. In: **Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas**, Campinas. Campinas: FACTA, p. 204–215, 2000.

NEGI, P. S. Plant Extracts for the Control of Bacterial Growth: Efficacy, Stability and Safety Issues for Food Application. **International Journal of Food Microbiology**, v. 156, p. 7, 2012.

NIKOLIC, M. et al.. Screening of Antimicrobial and Antioxidant Activity of Commercial *Melaleuca alternifolia* (tea tree) Essential Oils. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, p. 3852–3858, 2012.

NORI, M. P.; et al.. Microencapsulation of Propolis Extract by Complex Coacervation. **LWT Food Science and Technology**, v. 44, p. 429–435, 2011.

O'BRIEN, J.; et al.. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421–5426, 2000.

OLIVEIRA, V. M. L. de; et al.. Aplicação do Método Checkboard para Avaliação de Sinergismo Antibacteriano em Óleos Essenciais: Uma Revisão. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**. v. 17, n. 4, p. 881–907, 2021.

PALOMINO, J.C.; et al.. Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in Mycobacterium tuberculosis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 46, n. 8, p. 2720–2722, 2002.

PAREDES, R.; et al.. Prevalence and Antimicrobial Resistance of *Escherichia coli* and *Salmonella* spp. in Animal Feed in Colombia. **Rev Panam Salud Publica**, v. 47, n. 57, 2023.

PENTEADO, A. L.; et al.. Avaliação in vitro de atividade antimicrobiana de óleos essenciais contra *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Higiene Alimentar**. V. 35, n. 293, 2021.

PULIGUNDLA, P.; LIM, S. Biocontrol Approaches Against *Escherichia coli* O157:H7 in Foods. **Review Foods**. Department of Food Science & Biotechnology - Gachon University. Seongnam - KOR. p. 19, 2022.

ROSTAGNO, M.H.; et al.. Preslaughter Holding Environment in Pork Plants is Highly Contaminated with *Salmonella enterica*. **Applied Environmental Microbiology**, v.69, p.4489–4494, 2003.

SANTOS, E.C.; et al.. **Uso de aditivos beneficiadores de crescimento sobre o desempenho, rendimento de carcaça, bactérias totais, pH intestinal e pH de rações de frangos de corte**. In: Promotores naturais de crescimento. Ave World, edição especial, p.8–9, 2006.

SILVA, Neusely da; et al.. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. Editora Blucher, 2017. E-book. ISBN 9788521212263.

SILVA, S. R. S. **Composição química, avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e deficiência hídrica de *Melaleuca alternifolia* Cheel crescida no Brasil**. 2001. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

SILVESTRE, W. P.; et al.. Pervaporation in the Separation of Essential Oil Components: A Review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 93, p. 42, 2019.

SIMÕES, R. P. et al. Efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infecção estafilocócica. **Revista Lecta. Bragança Paulista**, n. 2, v. 20, p. 143-152, 2002.

STARK, K D.C.; et al.. Differences and similarities among experts' opinions on *Salmonella* enteric dynamics in swine pre-harvest. **Preventive Veterinary Medicine**, n.53, p.7–20, 2002.

TIMILSENA, Y. P.; HAQUE, MD. A.; ADHIKARI, B. Encapsulation in the Food Industry: A Brief Historical Overview to Recent Developments. **Food and Nutrition Sciences**, v. 11, n. 6, p. 481–508, 2020.

TROMBETTA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474–2478, 2005.

XIAO, D.; DAVIDSON, P. M.; ZHONG, Q. Spray-Dried Zein Capsules with Coencapsulated Nisin and Thymol as Antimicrobial Delivery System for Enhanced Antilisterial Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59(13), p. 7393–7404, 2011.

Zuidam, N.J. and Nedovic, V.A.. Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. **Springer Science + Business Media**, v. 11, n. 10, 2010.