

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E
BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO**

**CONDIÇÕES MICROBIOLÓGICAS DO AMBIENTE E INSUMOS
DE AVIÁRIOS E SUSCEPTIBILIDADE DE *Escherichia coli* A
ANTIMICROBIANOS NATURAIS.**

LÍVIA SOUZA GUIMARÃES ROCHA E SILVA

**CRUZ DAS ALMAS – BAHIA
ABRIL-2016**

**CONDIÇÕES MICROBIOLÓGICAS DO AMBIENTE E INSUMOS
DE AVIÁRIOS E SUSCEPTIBILIDADE DE *Escherichia coli* A
ANTIMICROBIANOS NATURAIS.**

LÍVIA SOUZA GUIMARÃES ROCHA E SILVA

NUTRICIONISTA

Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, 2013

Dissertação submetida ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia e Embrapa Mandioca e Fruticultura, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Microbiologia Agrícola.

Orientadora: Dr^a Isabella de Matos Mendes da Silva

Co-Orientador: Dr. Paulo José Lima Juiz

CRUZ DAS ALMAS – BAHIA

ABRIL-2016

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RECÔNCAVO DA BAHIA
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS AMBIENTAIS E
BIOLÓGICAS
EMBRAPA MANDIOCA E FRUTICULTURA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA AGRÍCOLA
CURSO DE MESTRADO

COMISSÃO EXAMINADORA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE
LÍVIA SOUZA GUIMARÃES ROCHA E SILVA

Profª Drª Isabella de Matos Mendes da Silva
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB
(Orientadora)

Profª Drª Ludmilla Santana Soares e Barros
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

Profª Drª Tatiana Pacheco Rodrigues
Universidade Federal do Recôncavo da Bahia – UFRB

Dissertação homologada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola em _____ conferindo o grau de Mestre em Microbiologia Agrícola em_____.

Aqueles que são meus maiores exemplos, o
que fiz e fizer será por e para vocês, meus pais!
Dedico.

AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa se concretiza, dentre tantas que irei percorrer. E, reconheço que essa caminhada, jamais é mérito de uma só pessoa, são muitos colaboradores para essa concretização.

Sou grata à Deus, fonte de todo conhecimento, aquele que me permitiu tudo isso ao longo de minha vida. É a ele a minha maior gratidão!

Aos meus grandes ídolos, Bento e Rita, por terem me proporcionado o estudo, por me incentivarem a conquistar meus objetivos, por me darem toda a estrutura para que me tornasse a pessoa que sou hoje. Aos meus irmãos que mesmo longe estiveram sempre presentes.

A William Cerqueira, obrigada meu amor pelo carinho, atenção, preocupação e colaboração ao longo de todos esses anos. Obrigada por me emprestar a sua família, que também já é minha, por me acolherem e receber como filha. Minha eterna gratidão a vocês, Família ALMEIDA CERQUEIRA!

A minha orientadora Prof^a Dr^a Isabella de Matos Mendes da Silva pela confiança, valiosos ensinamentos, dedicação e atenção doada ao longo dessa trajetória que é galgada desde a graduação. Um exemplo de profissionalismo e dedicação que tenho como meta em poder alcançar.

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Paulo José Lima Juiz, pelas orientações, disponibilidade e inestimável colaboração na execução da pesquisa.

Aos professores Dr. Ricardo Mendes da Silva e Msc Maykson Costa de Jesus pela colaboração inicial para o desenvolvimento da pesquisa e toda contribuição ao longo da execução.

A palavra mestre, nunca fará justiça aos professores dedicados aos quais sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia Agrícola da UFRB, em especial a colaboradora Carla Damasceno pela resolubilidade burocrática.

A Gabrielly Neiva, Monique Lima, Allana Santos, Noely Marques e Lucas Andrade pelo companheirismo e tornar menos árdua a trajetória.

Ao matadouro avícola e criadores de frango que permitiram a coleta das amostras.

À FAPESB pela concessão da bolsa.

MUITO OBRIGADA!

*“Se eu vi mais longe,
foi por estar sobre ombros de gigantes”
(Isaac Newton).*

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Capítulo 2	Características dos <i>primers</i> utilizados para a PCR em insumos e ambiente de aviários de um matadouro avícola do Recôncavo da Bahia	66
Tabela 1 – Capítulo 3	Características dos <i>primers</i> utilizados para a PCR em insumos e ambiente de aviários, celulite e fígado de frangos de um abatedouro avícola do Recôncavo da Bahia.	75
Tabela 2 – Capítulo 2	Componentes utilizados na realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação dos genes <i>iss</i> e <i>iutA</i> em amostras de insumos e ambiente oriundos de aviários.	66
Tabela 2 – Capítulo 3	Componentes químicos identificados no óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> e seus respectivos índices de Kovats calculados (IKCalc), índices de Kovats da literatura (IKLit).	79
Tabela 3 – Capítulo 2	Frequência de Coliformes Totais (CT) e <i>Escherichia coli</i> (<i>E. coli</i>) em amostras de ambiente e insumos de aviários do Recôncavo da Bahia.	67
Tabela 3 – Capítulo 3	Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (CMB) determinada em mg.mL ⁻¹ de óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> e extrato de <i>Agave sisalana</i> contra ATCC 25922 e <i>Escherichia coli</i> patogênica isoladas de insumos e ambiente de aviários, celulite e fígado de frangos de um abatedouro avícola do Recôncavo da Bahia.	75

Tabela 4 – Capítulo 2	Frequência de Coliformes e Totais <i>Escherichia coli</i> em aviários do Recôncavo da Bahia.	68
Tabela 5 – Capítulo 2	Frequência de <i>Escherichia coli</i> e genes de virulência em amostras de ambiente e insumos de aviários do Recôncavo da Bahia.	69

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	Coleção de Tipos de Cultura Americana
BHI	Infusão de Cérebro Coração
°C	Grau Celcius
CBM	Concentração bactericida mínima
CCAAB	Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical & Laboratory Standards Institute
DAEC	<i>Escherichia coli</i> que adere difusamente
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EaggEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica
EMB	Eosina azul de metileno
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigênica
ExPEC	<i>Escherichia coli</i> extraentérica
FAPESB	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
IK	Índices de Kovats
kV	Quilovolt
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
mg	miligrama
mL	mililitro
NMEC	<i>Escherichia coli</i> de meningite neonatal
PCR	Reação em Cadeia de Polimerase
pH	Potencial Hidrogeniônico
REDEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogênica para coelhos
SANUTRI	Núcleo de Segurança Alimentar e Nutricional

SePEC	<i>Escherichia coli</i> causadora de septcemia
SIF	Serviço de Inspeção Federal
UEPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogênica
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFRB	Universidade Federal do Recôncavo da Bahia
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
µg	micrograma
µL	microlitro

ÍNDICE

Página

RESUMO

ABSTRACT

INTRODUÇÃO.....18

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura: Presença de Coliformes Totais e *Escherichia coli* nos aviários e sua susceptibilidade frente a antimicrobianos.....21

Resumo.....22

Abstract.....22

A avicultura brasileira no mundo e no Brasil.....23

Inspeção industrial e sanitária de carne de frango.....23

Presença de Coliformes Totais e *Escherichia coli* em frangos.....25

Escherichia coli com potencial patogênico.....29

Uso de antimicrobianos na criação de frangos.....32

Efeito inibitório de compostos naturais extraídos de plantas medicinais sobre o crescimento de *Escherichia coli*.....34

REFERÊNCIAS.....40

CAPÍTULO 2

Presença de Coliformes Totais e *Escherichia coli* em ambiente e insumos de aviários associados a fatores de virulência.....54

Abstract.....55

Resumo.....55

Introdução.....	56
Metodologia.....	57
Coleta de amostras.....	57
Quantificação de coliformes totais e <i>Escherichia coli</i>	57
Pesquisa de genes de virulência de patotipos de <i>Escherichia coli</i>	58
Análise Estatística.....	58
Resultados.....	58
Discussão.....	59
Conclusão.....	62
REFERÊNCIAS	62
CAPÍTULO 3	70
Atividade antimicrobiana de compostos naturais frente a cepas de <i>Escherichia coli</i> patogênica isoladas do processo produtivo de carne de frango.....	71
Resumo.....	71
Abstract.....	72
Introdução.....	72
Metodologia.....	75
Microrganismo.....	75
Compostos naturais extraído de plantas.....	76
Teste de Susceptibilidade aos antimicrobianos.....	77
Resultados e Discussão.....	78
Conclusão.....	85

REFERÊNCIAS.....	86
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	91
ANEXOS.....	92

RESUMO

SILVA, L. S. G. R. CONDIÇÕES MICROBIOLÓGICAS DO AMBIENTE E INSUMOS DE AVIÁRIOS E SUSCEPTIBILIDADE DE *Escherichia coli* A ANTIMICROBIANOS NATURAIS.

O trabalho objetivou determinar a população de Coliformes Totais e *Escherichia coli* (*E. coli*) em amostras de insumos e ambiente dos aviários, incluindo ração, água e cama, bem como a sensibilidade frente a antimicrobianos naturais. No período de julho a dezembro de 2014 foram coletadas 72 amostras de insumos e ambiente dos aviários, sendo verificada a população de Coliformes Totais e *E. coli*, pelo método rápido de contagem Petrifilm™ (3M Company), (AOAC 998.8) e nas amostras de água, por meio do método rápido cromogênico ReadyCult® (Merck). As amostras de *E. coli* foram analisadas quanto a presença dos genes de virulência *iss* e *iutA*, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) e submetidas a teste de sensibilidade antimicrobiana frente a compostos naturais. Para o teste de atividade antimicrobiana foram utilizados óleo essencial extraído de folhas e inflorescência de *Lippia origanoides* (Kunth) e extrato de *Agave sisalana* (Perrine), utilizando o teste de microdiluição em caldo proposto pelo CLSI (2003) com modificações. Os Coliformes Totais foram detectados em 82,85% das amostras do ambiente e insumos, com população entre 1,48 a 8,40 log UFC/g. Cepas de *E.coli* estavam presentes em ambiente e insumos em 71,42% das amostras, com população entre <0,95 a 7,79 log UFC/g. Dentre as amostras do ambiente e insumos dos aviários, a cama configurou-se como o local de maior contaminação microbiana apresentando média da população de 5,36 log UFC/g, seguido das amostras de ração do comedouro (3,00 log UFC/g), ração do depósito (2,60 log UFC/g) e água do bebedouro que esteve presente em 78,57% das amostras. Os genes *iutA* e *iss* foram detectados em 92,0% e 34,0% dos isolados de *E. coli*, respectivamente, obtendo-se de forma concomitante a presença dos genes de virulência em 34,0% dos isolados. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) apresentada pelo óleo essencial extraído

de folhas e inflorescência de *L. origanoides* foi de 0,54 mg.mL⁻¹ para a *E. coli* patogênica isolada da lesão de celulite, fígado, água, ração e cama, considerada como bacteriostática. A CIM para a ATCC 25922 foi 1,09 mg.mL⁻¹, avaliada como bacteriostática. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os isolados da ração foi de 1,09 mg.mL⁻¹, fígado, água e cama apresentaram CBM de 2,18 mg.mL⁻¹, enquanto que os isolados de lesão de celulite e cepa padrão (ATCC 25922) apresentaram CBM de 4,37 mg.mL⁻¹ e 8,75 mg.mL⁻¹, respectivamente. Em contraposto, o extrato de sisal não apresentou atividade antibacteriana em nenhuma das concentrações avaliadas frente a todas as cepas estudadas. Desta forma, considerando a presença de *E. coli* no processo produtivo de carne de frango, tendo em vista o seu potencial zoonótico, configura-se um risco para consumidores deste produto. Portanto, a utilização de folhas de *L. origanoides* no ambiente produtivo de carne de frango, possibilita a inibição e/ou redução da multiplicação microbiana, conferindo uma segurança ao consumidor final, além de caracterizar uma alternativa viável em substituição as medidas preventivas a partir de antimicrobianos sintéticos.

Palavras chave: Segurança dos Alimentos, Aves, Patogenicidade de *Escherichia coli*, Inspeção Sanitária, Fitoterápico.

ABSTRACT

SILVA, L. S. G. R. MICROBIOLOGICAL CONDITIONS OF ENVIRONMENT AND INPUTS AVIARIES AND SUSCEPTIBILITY *Escherichia coli* A NATURAL ANTIMICROBIAL.

The study aimed to determine the population of Total Coliforms and *Escherichia coli* (*E. coli*) in samples of raw materials and environment of aviaries, including feed, water and bed. In the period from July to December 2014 were collected 72 samples of raw materials and environment of aviaries, it is verified the population of Total Coliforms and *E. coli*, the quick method of counting Petrifilm™ (3M Company), (AOAC 998.8) and in the water samples through rapid method chromogenic Readycult® (Merck). Samples of *E. coli* were analyzed for the presence of virulence genes *iss* and *iutA*, using the Polymerase Chain Reaction (PCR) and subjected to antimicrobial susceptibility testing natural compounds. For the antimicrobial activity test were used essential oil extracted from leaves and inflorescence of *Lippia origanoides* (Kunth) and extract *Agave sisalana* (Perrine), using the broth microdilution test proposed by CLSI (2003) with modifications. The Total Coliforms were detected in 82.85% of environmental samples and inputs, with between 1.48 to 8.40 log UFC / g. Strains of *E. coli* were present in the environment and inputs in 71.42% of samples, with between 0.95 to 7.79 log UFC/g. Among the samples of the environment and inputs of poultry, the bed was configured as the sample increased microbial contamination with an average population of 5.36 log UFC/g, followed by the feed trough samples (3.00 log UFC/g), feed shed (2.60 log UFC/g) of water cooler water that was present in 78.57% of samples. The reaction to the virulence gene *iutA* obtained a prevalence of 92.0% in *E. coli* isolates and 34.0% for the virulence gene *iss*, obtaining concomitantly the presence of virulence genes in 34.0% of isolates. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) presented by the essential oil extracted from leaves and inflorescences of *L. origanoides* was 0.54 mg.mL⁻¹ for pathogenic *E. coli* isolated from cellulitis injury, liver, water, feed and bed, considered as

bacteriostatic. The MIC to ATCC 25922 was 1.09 mg.mL^{-1} , assessed as bacteriostatic. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for isolated from the reaction was 1.09 mg.mL^{-1} , liver, water and bed showed MBC 2.18 mg.mL^{-1} , whereas cellulite injury isolated and standard strain (ATCC 25922) showed CBM 4.37 mg.mL^{-1} and 8.75 mg.mL^{-1} , respectively. In counterposed, sisal extract presented no antibacterial activity in any of the evaluated the concentrations of all studied strains. Thus, considering the presence of *E. coli* during the production process of chicken, in view of its potential zoonotic, sets up a risk to consumers in this product. Therefore, the use of *L. origanoides* leaves in the production of chicken environment, allows for the inhibition and / or reduction of microbial growth, conferring a safety to the final consumer, as well as characterize a viable alternative preventive measures from synthetic antimicrobials.

Keywords: Food Safety, Poultry, Pathogenic *Escherichia coli*, Sanitary Inspection, Phytotherapeutic.

INTRODUÇÃO

A grande necessidade de investimentos na produção alimentícia alavancou a avicultura brasileira, que cresce a cada ano, devido à alta qualidade proteica, associada ao baixo custo em relação a outros tipos cárneos (SILVA et al., 2012).

Estudos aprofundados sobre nutrição, convertibilidade e desenvolvimento de dietas especiais para as várias etapas da vida dos frangos mostram que essas aves são eficientes ao transformar alimento em massa corpórea. Além disso, a gestão de todas as etapas da produção, com auxílio tecnológico intenso e aperfeiçoamento no manejo operacional e sanitário explica o consumo elevado de carne de frango no cenário mundial (ABEF, 2014).

Contudo, essa crescente demanda do consumidor implica em alta produtividade e propicia a disseminação de microrganismos patogênicos na indústria aviária (BARROS et al., 2012). A segurança e qualidade dos alimentos como a carne *in natura* pode ser estimada pela contagem de microrganismos indicadores, como Coliformes Totais e *Escherichia coli*, estimadores de falhas na higiene relacionados a níveis significativos de enteropatógenos (JAY, 2000). Ressalta-se que *Escherichia coli* destaca-se como um agente responsável por perdas econômicas na indústria avícola e riscos à saúde do consumidor (SILVA et al. 2012).

Dentro do grupo dos Coliformes Totais existe o grupo dos Coliformes Termotolerantes ou a 45° C, que recebem essa denominação devido à capacidade de desenvolver e fermentar lactose com produção de gás à temperatura de 44° C - 45° C. São constituídos pelos gêneros *Escherichia*, *Enterobacter*, *Klebsiella*, e *Citrobacter*. tendo como principal representante a espécie *E. coli*, visto que é mais abundante e a única de origem fecal (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Embora a legislação brasileira vigente não determine parâmetros para a avaliação deste grupo de bactérias, a determinação da contaminação por Coliformes Totais em alimentos é importante, visto que a presença destes

microrganismos relacionada com a qualidade higiênico-sanitária do produto (PENTEADO; ESMERINO, 2011).

E. coli pode ser encontrada na microbiota intestinal de seres homeotérmicos, constituindo-se na espécie predominante entre as bactérias intestinais anaeróbicas facultativas e não esporuladas, pertencendo à família Enterobacteriaceae, sendo um bacilo Gram-negativo fermentador da glicose e lactose e produtora de ácido e gás. *E. coli* patogênica para aves (APEC) é o agente etiológico de doenças extra-intestinais como aerossaculite, pericardite e septicemia, geralmente denominadas como colibacilose (ITO et al., 2007), que podem ser controladas por medidas profiláticas e uso de antibacterianos (McMULLIN, 2004).

Com vistas a redução das perdas financeiras, antimicrobianos sintéticos são utilizados como promotores de crescimento e, conseqüentemente, previnem a contaminação por microrganismos patogênicos (FARIA et al., 2009; SOUZA et al., 2010; DALOLIO et al., 2015). Entretanto, o uso dessa prática acarretou em linhagens bacterianas resistentes aos fármacos utilizados, ocasionando um problema de saúde pública (FRASÃO et al., 2015).

A adição de antibacterianos em doses subclínicas, como promotores de crescimento, tem gerado preocupações para a saúde pública, como a emergência de bactérias resistentes a antimicrobianos, bem como a indesejada presença de resíduos destes fármacos em derivados cárneos, leites e ovos. Nesse contexto, alternativas ao uso de antibióticos são urgentemente requeridas, tais como o uso de compostos naturais extraídos de plantas medicinais, incluindo óleos essenciais e/ou extratos herbais (BRUGALLI, 2003).

Os Óleos Essenciais (OES), extraídos de plantas medicinais, representam complexas misturas de substâncias naturais, tradicionalmente utilizadas para acentuar gosto ou aroma de alguns alimentos. Constituem-se de substâncias, cujos componentes incluem hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, ácidos orgânicos fixos, em diferentes concentrações. A maior parte da atividade antimicrobiana de OES parece estar associada aos compostos fenólicos (SIMÕES; SPITZER, 2000), sendo o efeito antimicrobiano relacionado, principalmente, à alteração da permeabilidade e integridade da membrana celular bacteriana (LAMBERT et al., 2001).

Não obstante, o uso de antimicrobianos naturais, pode apresentar como uma alternativa economicamente viável para assegurar a qualidade microbiológica da carne de frango e proporcionar uma segurança para o consumo deste produto.

Diante do exposto, enfatiza-se a necessidade de traçar o perfil de sensibilidade a antimicrobianos em cepas de *E. coli* isoladas do ambiente produtivo (cama), insumos (água e ração), celulite e fígado de frango com o objetivo de determinar novas alternativas do controle da multiplicação de microrganismos patogênicos, destacando-se o uso de antimicrobianos extraídos de plantas medicinais na perspectiva da garantia da inocuidade dos cortes de frango, e conseqüentemente, o aumento da sua estabilidade durante o armazenamento.

Este trabalho foi dividido em três capítulos: a revisão de literatura está representada no primeiro capítulo, abordando aspectos importantes acerca da avicultura, dos Coliformes Totais e a *Escherichia coli* e da sensibilidade da *E. coli* frente a agentes antimicrobianos naturais.

O segundo e terceiro capítulos, em forma de artigo, relatam os resultados da pesquisa de Coliformes Totais, *E. coli* e genes de virulência da *E. coli*, em amostras do ambiente produtivo do frango (cama), insumos (ração e água), lesões de celulite e fígado de frango e o teste de sensibilidade da *E. coli* frente a antimicrobianos naturais.

CAPÍTULO 1

Revisão de Literatura: Presença de Coliformes Totais e *Escherichia coli* nos aviários e sua susceptibilidade frente a antimicrobianos.

RESUMO - O consumo de carne de frango está aumentando em todo o mundo e a elevação da oferta vem atendendo a essa crescente demanda. Entretanto, a avicultura, em especial a industrial, tem novos desafios em diversos aspectos, dentre eles destaca-se o sanitário. As principais fontes de contaminação do frango são oriundas do ambiente produtivo, por meio da cama, água e/ou ração, sendo o frango o veículo da disseminação de patógeno ao longo da cadeia produtiva. Um dos principais fatores de contaminação é a presença de celulite, que funciona como a porta de entrada de microrganismos na ave. A intensa produção do setor avícola propicia a disseminação de microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli*, sendo considerado um agente etiológico de infecções invasivas em seres homeotérmicos. A avicultura industrial utiliza antimicrobianos, visando a redução de perdas financeiras, potencializando a produção em larga escala em tempo reduzido. O uso de antimicrobianos em frangos de corte pode ser classificado em três categorias de dosagem, terapêutica, profilática e promotor de crescimento. O uso de antibióticos como promotores de crescimento realiza-se com dosagem inferior a CIM (Concentração Inibitória Mínima), com a finalidade de controlar o crescimento exacerbado e indesejado de determinadas populações microbianas. Por outro lado, o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento na produção animal caracteriza-se como uma das causas da origem da resistência destes microrganismos. Contudo, há um consenso de que a proibição total dos antimicrobianos promotores de crescimento resultaria em menor lucratividade para o setor. Para que se possam ter dietas sem o uso desses compostos, faz-se necessária a introdução de novas estratégias, como o uso de antimicrobianos naturais, visando suprir as necessidades dos promotores de crescimento sintéticos, garantindo o desempenho e a saúde das aves. Desta forma, o uso de fitoterápicos pode representar uma alternativa economicamente viável para manter a viabilidade econômica da produção, assegurar a qualidade microbiológica da carne de aves e proporcionar segurança alimentar para o consumidor.

Palavras chaves: Segurança dos Alimentos, Aviários, APEC, *iss*, *iutA*, Óleo essencial.

ABSTRACT- The chicken meat consumption is increasing worldwide and the increase in supply is meeting this growing demand. However, poultry, in particular industrial, it has new challenges in many ways, among them stands out the health. The main chicken contamination sources are from the productive environment, through the bed, water and / or feed, it is the chicken vehicle the spread of the pathogen along the production chain.

The main factor of contamination is the presence of cellulite, which serves as the input port of the microorganism in the bird. The intense production of the poultry sector provides the spread of pathogenic microorganisms, as *Escherichia coli*. It is considered an etiological agent of invasive infections in humans and animals broad spectrum. The poultry industry uses antibiotics, in order to reduce financial losses, leveraging the large-scale production in a short time. The use of antimicrobials in broiler chickens can be classified into three categories dosage, therapeutic, prophylactic and growth promoter. The use of antibiotics as growth promoters is carried out with lower dosage MIC (Minimum Inhibitory Concentration), in order to control the undesired growth and exacerbated certain microbial populations. On the other hand, the use of antimicrobials as growth promoters in animal production is characterized as one of the causes of the origin of resistance of these microorganisms. However, there is a consensus that a total ban on antimicrobial growth promoters results in lower profitability for the sector. In order to have diets without the use of these compounds, it is necessary to introduce new strategies, as the use of natural antimicrobial, in order to meet the needs of synthetic growth promoters, ensuring the performance and health of birds. Thus, the use of natural antimicrobials may represent an economically viable alternative to ensure the microbiological quality of poultry meat and provide food security for the consumer.

Keywords: Food Safety, aviaries, APEC, *iss*, *iutA*, Essential oil.

A AVICULTURA BRASILEIRA NO MUNDO E NO BRASIL

O Brasil é o terceiro maior produtor de frango do mundo, produzindo em 2014 12.691.000 toneladas, ficando atrás dos Estados Unidos da América (EUA) com 17.254.000 toneladas, e China, com 13.000.000 toneladas, e é o maior exportador mundial da carne de frango, exportando no mesmo ano 4.099.000 toneladas de frango. Entre os criadores de frango no país, o Estado do Paraná lidera o ranque, seguido de Santa Catarina e posteriormente Rio Grande do Sul. A Bahia ocupa a décima primeira colocação em relação aos produtores brasileiros, sendo o segundo maior produtor do nordeste no ano de 2014, ficando atrás de Pernambuco (ABPA, 2015).

Para manutenção dessa produção, o país necessita aumentar e melhorar sua eficiência, atendendo aos aspectos de qualidade da carne e exigências relacionadas ao bem-estar animal e preservação do meio ambiente, tão valorizados pelo consumidor da

atualidade (PASCHOAL; OTUTUMI; SILVEIRA, 2012). Destaque deve ser dado à redução de suas perdas durante a produção e processamento da carne de frango. Segundo Maschio e Raszl (2012) grande parte das perdas ocorre dentro do matadouro, principalmente associadas às condenações parciais e totais da carcaça.

A alta produtividade da avicultura brasileira deve-se a característica de ser uma atividade economicamente eficiente, com altos índices zootécnicos, incluindo viabilidade, conversão alimentar e ganho de peso. Esses fatores associados a baixo custo de produção, boa qualidade dos produtos e um elevado *status* sanitário, permitem uma alta competitividade da carne de frango brasileira (JACOBSEN, 2007). Entretanto, a avicultura, em especial a industrial, tem novos desafios, com peculiaridades culturais e geográficas diversas e sempre na busca de elevados níveis de excelência em qualidade de produtos, especialmente a sanitária.

INSPEÇÃO INDUSTRIAL E SANITÁRIA DE CARNE DE FRANGO

O serviço oficial da inspeção sanitária dos matadouros avícolas, que é representado pelo Serviço de Inspeção Federal (SIF) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) e suas representações dos estados e municípios, são os órgãos responsáveis pela garantia da qualidade da carne e vísceras para o consumo (PONTES, 2004).

A condenação parcial da carcaça de frango é determinada pela presença de inflamação local ou de algum órgão e a condenação total ocorre se existir inflamação de caráter sistêmico em carcaça ou vísceras. A inspeção *post-mortem* de frango é efetuada durante o abate, onde são realizados exames macroscópicos de carcaça e vísceras, e, se for necessária, é efetuada a palpação ou cortes. Esta atividade é regulamentada segundo a portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento do Brasil. (BRASIL, 1998).

Vieira (2010) observou que as carcaças condenadas por celulite podem apresentar lesões em outros órgãos, como no coração, sacos aéreos, fígado e ossos, sendo que *E.coli* tem sido isolada em pelo menos um desses órgãos além da celulite.

Ao avaliar o impacto financeiro de um matadouro-frigorífico de Inspeção Federal localizado no estado de Santa Catarina, em decorrência das condenações *post-mortem* parciais e totais de frangos no período de Setembro de 2006 a Agosto de 2007, Giotto (2008) concluiu que o aspecto repugnante, ascite e colibacilose eram as causas mais

incidentes em condenações totais, enquanto que as condenações parciais eram mais frequentes por dermatose, artrite e celulite, culminando com prejuízo em decorrência das condenações em cerca de 3,7 milhões de reais.

A inspeção de frangos é dividida em linhas de inspeção, A, B, e C. A primeira etapa de inspeção, A, realiza-se a análise interna da ave, verifica-se a cavidade torácica e abdominal e os órgãos internos (sacos aéreos, pulmões, rins e órgãos sexuais). Na segunda etapa de inspeção, B, são examinadas as vísceras. Na última etapa de inspeção, C, avaliam-se as superfícies externas (BRASIL, 1998).

A determinação de inadequação da carcaça de frango para o consumo humano tem por objetivo zelar pela saúde dos comensais, visto que o consumo destes produtos de origem animal constitui um risco de aquisição de doença alimentar, em potencial o fígado de frango, que pela sua natureza química, o manejo e a condição de manipulação favorecem a contaminação bacteriana (BARCELLOS et al., 2006).

Conforme Carvalho et al. (2005) a fonte inicial de contaminação microbiana são as próprias aves que são encaminhadas para o abate e o número de microrganismos pode ser influenciado pela condição higiênica do abate e processamento. Santana et al. (2008) ao observarem as causas de condenação de carcaças de aves em matadouros localizados no estado de Goiás, Brasil, constataram que o principal motivo das condenações da carcaça de frango foi a presença de celulite associado a contaminação de microrganismo, como da espécie *Escherichia coli*.

Mesmo com todo o investimento tecnológico utilizado na avicultura que garanta a sanidade dos produtos, qualquer falha que possa gerar contaminação ou inadequação do consumo deste tipo de carne, pode gerar prejuízos econômicos devido às restrições sanitárias (VIEIRA, 2010). A produção veloz demanda intensa fiscalização, sendo assim pequenas falhas podem gerar prejuízos à saúde dos consumidores (SILVA, 2009).

PRESENÇA DE COLIFORMES TOTAIS E *Escherichia coli* em frangos

A verificação da presença de microrganismos é de fundamental importância para determinar a qualidade dos alimentos e a sua inobservância pode ocasionar riscos a saúde pública.

Na avaliação da segurança e da qualidade microbiológica dos alimentos alguns microrganismos são denominados indicadores de qualidade microbiológica e considerados relevantes. Estes microrganismos, quando presentes em um alimento,

podem fornecer informações sobre as condições sanitárias e a possibilidade de contaminação por patógenos (SILVA, 2002).

De acordo com Oliveira e Salvador (2011) dentro do grupo de microrganismos indicadores da qualidade microbiológica de alimentos, destacam-se os Coliformes Totais e Termotolerantes.

O grupo dos Coliformes Totais é constituído por membros da família Enterobacteriaceae, incluindo *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter* spp. e *Escherichia* spp. Considerando que a bactéria *E. coli* representa o principal membro do grupo dos Coliformes Termotolerantes, estando presente em vários alimentos, a determinação deste microrganismo pode indicar contaminação fecal recente e eventual presença de organismos patogênicos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A determinação da contaminação por Coliformes Totais em alimentos é importante, visto que a sua presença está relacionada com a qualidade higiênico-sanitária do produto (PENTEADO; ESMERINO, 2011). Salienta-se que não há limite máximo estabelecido pelos órgãos competentes para Coliformes Totais em frangos, contudo a presença desse grupo de microrganismos indica falta de condições higiênicas adequadas em alguma etapa da cadeia produtiva, sendo considerado como relevante na medida em que a contaminação por coliformes pode constituir um risco à saúde do consumidor (ELPO; NEGRELLE; GOMES, 2004).

Em um estudo realizado por Cardoso et al. (2005) em dois matadouros avícolas na cidade de Descalvado (SP), foram colhidas 120 amostras em ambos estabelecimentos. Os resultados demonstraram que 13,3% (8) das amostras do estabelecimento A e 10% (6) das amostras do B, apresentaram índices de Coliformes Totais significativos.

Carvalho et al. (2005), ao avaliar cortes de frango, coxa/sobrecoxa, fígado e moela, observaram população para Coliformes Totais mínima de $1,5 \times 10^3$ e máxima de $4,3 \times 10^3$ por unidade, apesar desse indicador não possuir limite segundo a legislação sanitária vigente. O estudo de Rodrigues et al. (2008), que avaliaram 25 amostras de frangos antes do chuveiro de higienização, após a depenagem, detectou que 76% (19) das amostras foi detectado Coliformes Totais, apresentando população média de 3,1 log UFC/g. Enquanto Leite e Franco (2008) analisaram 30 coxas de frango resfriadas e na contagem de Coliformes Totais, a média foi $2,0 \times 10^7$ /UFC com valores variando de < 3 Coliformes Totais/g a $> 2,4 \times 10^8$ /UFC, sendo que somente uma (3,33%) apresentou o menor valor.

Embora não existam padrões estabelecidos para Coliformes Totais pelas legislações sanitárias em vigor, números elevados destes coliformes indicam que está ocorrendo uma deficiência na qualidade de higienização interna nos abatedouros, o que deve ser revisto

para evitar posteriormente contaminações que possam prejudicar a qualidade dos produtos (CARDOSO et al., 2005).

A intensa produção do setor avícola propicia a disseminação de microrganismos patogênicos, como *Escherichia coli*, que pode ser encontrado na microbiota intestinal de mamíferos e aves. Apesar de ser integrante da microbiota intestinal desses animais, *E. coli* é responsável por infecções entéricas e extra-intestinais, sendo considerado um agente etiológico de infecções invasivas no ser-humano e animais (RON, 2006).

A contaminação por *E. coli* era considerada pelas indústrias alimentícias apenas como falha nas práticas de higiene, porém atualmente, com a descoberta de vários sorotipos desta bactéria que possuem um grande potencial patogênico, sabe-se que a contaminação humana pode gerar infecções graves e até levar a óbito (GERMANO; GERMANO, 2011).

Infecções causadas por *E. coli* podem ser denominadas de Colibacilose, caracterizadas por infecção localizada ou sistêmica e as implicações incluem colisepticemia, doença respiratória, síndrome da cabeça inchada, coligranuloma, peritonite, celulite, salpingites entre outras (BARNES; NOLAN; VAILLANCOUT, 2008) responsáveis por prejuízos econômicos na indústria avícola, sendo a colibacilose frequentemente associada à mortalidade embrionária e do plantel, pior conversão alimentar, menor desenvolvimento corpóreo e altos custos com medicamentos, além do aumento da condenação de carcaças devido às lesões por colisepticemia (ANDREATTI FILHO, 2006).

Neste contexto, a presença de celulite em carne de frango apresenta um risco para saúde da população, visto que a *E. coli* pode estar presente sozinha ou em associação com outras espécies bacterianas nesses alimentos (ANDRADE et al., 2006; VIEIRA et al., 2006). Vaillancourt e Barnes (2003) relataram que a celulite é um processo infeccioso que emergiu como uma patologia aviária de relevância financeira devido ao crescimento do número de condenações de carcaças, redução da qualidade do processamento industrial e aumento dos custos relativos às condenações parciais e ao reprocessamento das carcaças afetadas. Santana et al. (2008) corroboram quando afirmam que a celulite pode ser considerada como uma das mais importantes causas de condenação de carne de frango em todo o mundo, gerando interesses em termos econômicos, por conta das perdas financeiras impostas aos produtores.

As lesões cutâneas favorecem a penetração dos microrganismos invasores e, mesmo cicatrizadas, não inviabilizam a infecção no tecido subcutâneo, ativando o sistema fagocítico mononuclear com a finalidade de conter a multiplicação do patógeno. No

entanto, bactérias que evadem da resposta imune são responsáveis por induzir a infecção (BRITO et al., 2002). Além disso, a presença de *E.coli* em celulites de frango, quando abertas, favorece a contaminação cruzada do microrganismo em linha de processamento (VIEIRA et al., 2006).

Neste contexto, a condenação de carnes e vísceras impróprias para o consumo visa zelar pela saúde pública, uma vez que a carne de frango e seus subprodutos, assim como todos os produtos de origem animal, são uma das mais importantes fontes de enfermidades veiculadas por alimentos (JAY, 2005).

Ao analisar a presença de *E. coli* como agente causal da celulite aviária em frangos de corte inspecionados em um matadouro de São Paulo, Andrade et al. (2006) isolaram *E. coli* em 76,6% das amostras. Corroborando com esse achado, Vieira et al., (2006) detectaram *E. coli* em 100% das amostras de celulite de frango provenientes de um matadouro sob inspeção estadual.

Não obstante, lesão de celulite pode configurar-se como carreador de patógeno que adentram no animal por meio da celulite e alcançam os órgãos internos. Rodrigues et al. (2008) afirmaram que a possível contaminação da carne de frango, pode ser devido à exposição da carne ao material das vísceras, no processo de eventração, que pode ter sido realizada de forma inadequada, indicando falha na condição higiênica de manipulação, o que confere risco a saúde do consumidor.

Em um estudo realizado por Silva et al. (2012) foram analisadas 62 amostras de fígados de frango oriundos de dois matadouros do Recôncavo da Bahia, sendo que 32 destas havia sido descartadas pela fiscalização e 30 liberadas para o consumo. Entretanto, os autores detectaram a presença de *E. coli* em 60% das amostras que haviam sido destinadas à alimentação humana, por serem consideradas próprias para o consumo.

Entretanto Silva (2011) salienta que as principais fontes de contaminação do frango são oriundas do ambiente produtivo, por meio da cama, água e/ou ração, sendo o frango veículo da disseminação do patógeno ao longo da cadeia produtiva, constituindo-se um problema de Vigilância Sanitária. Dessa forma, os processos produtivos, cada vez mais intensos e velozes, demandam controle e fiscalização da sanidade mais eficientes e sempre baseados em conhecimento científico, posto que pequenas falhas podem gerar grandes perdas financeiras, além de produzir agravos à saúde.

Fator produtivo que merece destaque na disseminação microbiana em aviários é a cama aviária, que possui função de proteção às aves, inviabilizando o contato direto com o chão, absorve a água, incorpora fezes e penas e contribui com redução das oscilações

da temperatura no galpão de cativeiro (GARCIA; LIMA; CALDARA, 2011). Entretanto configura-se um nicho microbiológico que alberga diversos patógenos, dentre eles a bactéria *Escherichia coli*, importante por determinar prejuízos na indústria avícola (FIORENTIN, 2005).

A biota da cama é uma combinação de material com fezes, urina e água. A umidade da cama, independente do tipo de material, é o principal fator determinante para o aumento da proliferação microbiana e aumento de temperatura com fermentação e liberação de gases como nitritos, nitratos, amônia e sulfato de hidrogênio (FERNANDES; FURLANETTO, 2004).

Contudo, a reutilização da cama nas criações é uma prática viável e desejável sob o ponto de vista de produção sustentável, desde que sejam adotados procedimentos eficientes para redução de riscos à saúde humana e das aves (SILVA et al., 2007). Deste modo, para que a cama possa ser reutilizada deve passar por tratamentos que inviabilizem a sobrevivência dos principais microrganismos patogênicos (GARCIA; LIMA; CALDARA, 2011).

Associado a cama, Nolan et al. (2013) atribuem a água um importante fator ambiental como facilitador da colonização de *E. coli* em aves e conseqüentemente a manutenção do ciclo de contaminação.

Preconiza-se que a água destinada ao consumo animal deva ter as mesmas características da água potável consumida pelos seres humanos, salientando que as aves ingerem duas a três vezes mais água que ração, podendo considerar a água como um importante veículo na transmissão de doenças infectocontagiosas, intoxicações por diversos elementos ou mantenedora da condição ideal para que determinados patógenos fiquem propícios a infectar as aves (GAMA et al., 2008).

Neste contexto, a celulite funciona como a porta de entrada do microrganismo na ave, principalmente através de lesões cutânea sofridos durante o crescimento o qual possibilita a entrada de microrganismo que estão no ambiente e insumos, penetrem nas aves (SILVA, 2011).

***Escherichia coli* COM POTENCIAL PATOGÊNICO**

A prevenção da contaminação por Enterobactérias deve ser realizada, acima de tudo, em função da larga distribuição ambiental do microrganismo e da conseqüente e

inevitável presença destes em alimentos, por meio de medidas de controle visando à diminuição da contaminação dos mesmos (COSTALUNGA; TONDO, 2002).

Atribui-se como principal fator de contaminação do frango, a presença de celulite, que pode ter como agente causal a *Escherichia coli*. Caracterizada pela inflamação, aguda e difusa, que ocorre no tecido subcutâneo profundo formando placas fibrinocaseosas (VIEIRA, 2010; SILVA, 2011).

Geralmente as cepas de *E. coli* são encontradas confinadas no lúmen intestinal, porém em hospedeiros imunosuprimidos ou quando as barreiras gastrointestinais são atravessadas elas podem causar doenças infecciosas, além disso, algumas cepas mutagênicas podem causar doenças em hospedeiros sadios (NAKAZATO et al., 2009).

É um mesófilo com temperatura ótima de crescimento de 37°C, entretanto possui capacidade de se desenvolver entre 7 e 42°C. Não apresenta termorresistência, sendo destruído a 60°C, mas é capaz de resistir por longo tempo em temperatura de refrigeração. O pH próximo do neutro propicia condições ótimas para o seu desenvolvimento (GERMANO; GERMANO, 2011).

A célula bacteriana é composta de estruturas antigênicas que contribuem para a caracterização dos sorogrupos de *E. coli*, baseados na identificação de antígenos somáticos “O”, relacionados a polissacarídeos da membrana externa; antígenos flagelares “H”, relacionados a proteínas dos flagelos; antígenos capsulares “K”, relacionados com polissacarídeos capsulares e antígenos fimbriais “F”, importantes no processo de aderência e colonização do hospedeiro (FRANCO; LANDGRAF, 2008). O antígeno “O” identifica o sorogrupo da cepa enquanto que a combinação do antígeno “O” com o antígeno “H” irá identificar o sorotipo (MENG; FENG; DOYLE, 2001).

Por meio da associação entre os fatores de virulência, as manifestações clínicas e a epidemiologia do hospedeiro, em relação as linhagens de *E.coli*, Kaper (2005) citou nove grupos de *E. coli* virulentos (patotipos): *E. coli* enteroagregativa (EaggEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogênica (EPEC), *E. coli* enterotoxigênica (ETEC), *E. coli* que adere difusamente (DAEC), *E. coli* uropatogênica (UPEC), *E. coli* de meningite neonatal (NMEC) e *E. coli* patogênica para aves (APEC). Ferreira e Knobl (2000) ainda citam o patotipo *E. coli* enteropatogênica para coelhos (REDEC) e Moulin-Schouleur et al. (2007) *E. coli* causadora de septicemia (SePEC).

Caprioli et al., (2005) afirmam que a identificação dos genes de virulência e associações entre eles configura-se como uma etapa crucial para a determinação

de doenças em animais e homens. Possibilitando, a partir desse reconhecimento genético, intervir efetivamente no impacto de saúde do hospedeiro.

Dentre os patótipos presentes nas aves destacam-se a EHEC e a APEC (RODRIGUEZ-SIEK et al., 2005; LEE et al., 2009).

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) tem a capacidade de destruir células epiteliais e produz uma citotoxina potente, a toxina Shiga (*Stx*), que provoca diarreia com ou sem a presença de sangue, síndrome urêmico-hemolítica, e é fatal para crianças (KAPER, 2005).

Referente a APEC, os fatores de virulência que apresentam destaque são expressão de adesinas, a produção de sideróforos e a capacidade de resistir a ação microbicida do soro (FERREIRA; KNOBL, 2000). Apesar da existência de fatores reconhecidos por sua contribuição para a virulência de APEC (*iutA*, *iron*, *iss*, *ompT* e *hlyF*), ainda não há um marcador definido ou conjunto de marcadores que definam o patótipo APEC (DZIVA E STEVENS, 2008).

Em 2008, Johnson et al., demonstraram que os genes plasmidiais *iutA* (que codificam receptores sideróforos) e *iss* (que codifica proteína de resistência ao sistema complemento) eram significativamente mais frequentes em cepas APEC, servindo como indicadores da patogenicidade. Delicato et al. (2003) ainda afirmam que a associação entre esses genes pode aumentar o potencial de virulência da APEC.

Estudo realizado com 238 amostras de lesão de celulite e cama aviária identificou a presença de 51,3% e 19,2% respectivamente, para o gene *iutA*, enquanto 80,6% e 53,8% respectivamente, para o gene *iss* (ROCHA, 2006).

Para controle e prevenção de infecções, a terapia antimicrobiana é comumente utilizada (MANTILLA et al., 2008), sendo que o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento é regulamentado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), por meio da Instrução Normativa N° 13 de dezembro de 2004, dispõe sobre o regulamento técnico para aditivos para produtos destinados à alimentação animal (BRASIL, 2004). Entre os aditivos mais empregados como promotores de crescimento, estão os antibióticos, maximizando a produção (CONOLLY, 2001), e ALBINO et al., (2006) afirmam que a relação custo-benefício favorece o seu uso.

Entretanto, o uso de antimicrobiano na produção animal e saúde humana devem ser prudentes, considerando os registros de mortes humanas por infecções causadas por bactérias multirresistentes (WHO, 2013).

Somando-se a isso, animais de produção têm sido considerados como principais fontes de integrons cerreadores de genes resistentes a antimicrobianos, servindo de fonte

de transferência de resistência não só para estirpes de *E. coli*, como para outras espécies bacterianas, promovendo mudança na prevalência de resistência de infecções humanas em diferentes partes do mundo (AJIBOYE et al., 2009).

Os humanos podem adquirir *E.coli* resistente a antimicrobianos ou genes resistentes oriundos de animais por meio do contato direto com animais, do ambiente ou alimentos. Essas células resistentes conferem perigo ao ser humano. Essas bactérias podem se instalar e promover a colonização do intestino ou transferir genes de resistência a outras bactérias que estiverem no mesmo ambiente, podendo promover uma infecção bacteriana com opções limitadas de tratamento (HAMMERUM; HEUER, 2009).

USO DE ANTIMICROBIANOS NA CRIAÇÃO DE FRANGOS

O uso de antimicrobianos em frangos de corte pode ser classificado em três categorias de dosagem: terapêutica, profilática e promotor de crescimento. A dosagem terapêutica é indicada para o tratamento de doenças diagnosticadas em lotes de aves, utilizam-se dosagens de antimicrobianos acima da concentração inibitória mínima (CIM). A dosagem profilática constitui 50% ou menos das doses terapêuticas, contudo a dose profilática deve atingir no animal a CIM na forma plasmática ou tissular. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento realiza-se com dosagem inferior a CIM, tendo a finalidade de controlar o aumento exacerbado e indesejado de determinadas populações microbianas, o objetivo não é eliminar uma determinada espécie ou cepa de microrganismo, mas evitar a sua multiplicação desordenada, reduzindo a secreção de substâncias tóxicas por estes microrganismos, reduzindo a inflamação do epitélio intestinal, evitando a ocorrência de diarreias (COLUSI 1993).

Soares (1996) concluiu que um promotor de crescimento ideal deve proporcionar um aumento do desempenho das aves, apresentar um bom custo/benefício, ser atóxico, não alterar drasticamente a microbiota intestinal, atuar exclusivamente ao nível intestinal, não estar envolvido em transferência de resistência, não possuir resistência cruzada com outros antimicrobianos (em especial os de uso na terapêutica humana), não deixar resíduos na carcaça dos animais após sua retirada e ser biodegradável.

Desta forma, os antimicrobianos promotores de crescimento, de acordo com Benício (1996), não esterilizam o intestino. Mas, proporcionam uma redução do número de bactérias aderidas à mucosa intestinal e a diminuição de bactérias produtoras de toxinas

e amônia, com isto, há uma diminuição de células inflamatórias na parede intestinal e diminuição do grau de descamação e renovação das vilosidades, tornando a parede mais lisa e delgada (SOARES, 1996).

É fato crescente a restrição ao uso de antimicrobianos em doses subterapêuticas como aditivos na nutrição animal em nível mundial, devido à possibilidade de desenvolvimento de resistência bacteriana (TOLEDO et. al, 2007).

Além disso, o uso destes medicamentos como promotores de crescimento preocupa a comunidade científica e a opinião pública, devido a possível presença de resíduos em alimentos de origem animal que pode prejudicar a saúde do consumidor, podendo contribuir para o aumento da incidência/prevalência de resistência microbiana na medicina humana (BRASIL, 2006).

A resistência aos agentes antimicrobianos se tornou uma das preocupações para a saúde humana, mas também está se tornando problema na medicina veterinária. Os antimicrobianos são usados mundialmente para tratamento e profilaxia de doenças infecciosas em animais de produção, como equinos, e animais de companhia e como promotores de crescimento. Em muitos estudos observou-se que o uso de antimicrobianos em animais contribuiu para o desenvolvimento de resistência antimicrobiana em humanos, pois muitas classes de antimicrobianos usadas em animais também são empregadas em seres humanos para tratar doenças graves, ocorrendo falha terapêutica, devido à transferência de bactérias resistentes pela cadeia alimentar (ARIAS; CARRILHO, 2012).

As cepas de *E.coli* resistentes a antimicrobianos podem ser isoladas de frango, que podem ser veículo dessas cepas , possibilitando a transferência de genes de resistência para microbiota humana (VICENTE et al., 2010).

A situação do uso indiscriminado de antimicrobianos no tratamento e prevenção de doenças é um problema de saúde animal e humana (MOTA et al., 2005). Ao avaliar a suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos Zanatta et al. (2004) constataram que 76% das cepas de *Escherichia coli* de origem aviária eram consideradas resistentes, assim como 77,5% eram multirresistentes e nenhuma droga foi eficiente para todas as amostras bacterianas avaliadas. Um percentual maior de cepas resistentes de *E. coli* de origem fecal foi verificado por Bogaard et al. (2001) na Turquia, que realizaram um estudo em frangos e perus a fim de avaliar a resistência de *E. coli*, bem como maior número de cepas multirresistentes.

Diante do exposto, é notável a necessidade de avaliar a sensibilidade das cepas de *E. coli* a novos compostos antimicrobianos que possam ser usados para tratamento e

prevenção de infecções originadas por este patógeno provenientes do consumo de carne de aves, evitando o surgimento e proliferação de cepas multirresistentes.

Desta forma, o uso de antimicrobianos de origem natural, comumente adicionados aos alimentos como condimentos, é uma alternativa eficaz e econômica. Estes condimentos são obtidos a partir de plantas aromáticas e especiarias que são ricas em óleos essenciais, substâncias estas que se caracterizam por sua notável atividade antimicrobiana, por esta razão, seus produtos derivados podem ser usados para retardar ou inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos e/ou deteriorantes (SANTOS, 2010).

EFEITO INIBITÓRIO DE COMPOSTOS NATURAIS EXTRAÍDOS DE PLANTAS MEDICINAIS SOBRE O CRESCIMENTO DE *Escherichia coli*.

A fitoterapia é utilizada pela humanidade há muitos anos, porém ficou esquecida por um tempo devido ao surgimento de novos fármacos quimicamente sintetizados, tendo novamente ganhando destaque nos últimos anos. O fenômeno da resistência bacteriana se tornou um problema de saúde pública, levando ao aumento das pesquisas em torno de substâncias para o combate das infecções, principalmente os antimicrobianos oriundos de plantas medicinais (GARVIL et al., 2013).

A busca por substâncias com atividade antimicrobiana tem dado atenção para os produtos naturais, sendo considerado o potencial da flora brasileira, que tem originado diversos estudos (AYRES et al., 2008).

A utilização de produtos naturais que substituam aditivos químicos tem sido uma opção para aqueles que procuram hábitos saudáveis e segurança alimentar. Os óleos essenciais de condimentos possuem atividade biológica sobre microrganismos, por isso sempre foram utilizados como conservantes de alimentos (PEREIRA et al., 2008). Esses óleos essenciais, extraídos dos vegetais por arraste de vapor de água ou outras técnicas, são compostos de grande importância em pesquisas, por serem potencialmente úteis no controle fitossanitário, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram diminuir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e microrganismos causadores de prejuízos nas indústrias alimentícias (SANTOS, 2004).

O uso de metabólitos secundários de plantas está crescendo e conquistando o mercado e a preferência dos consumidores por apresentarem benefícios à saúde, bem como menores impactos ao meio ambiente. Portanto, a pesquisa fitoquímica apresenta-se

como um método útil, buscando técnicas analíticas e instrumentais que permitem o isolamento e elucidação de inúmeros compostos. Esses metabólitos possuem potencial para uso na indústria alimentícia, na qual a possibilidade de contaminações é grande (PEREIRA et al., 2008).

O óleo essencial (OE) extraído de plantas apresentam atividade antimicrobiana contra um grande número de bactérias, incluindo algumas espécies resistentes a antimicrobianos. A composição química desses óleos varia dependendo do clima, da estação do ano, das condições geográficas, período de colheita e a técnica de destilação empregada (BERTINI et al., 2005).

As substâncias isoladas de plantas que possuem atividade antimicrobiana são bem diferentes daqueles obtidos a partir de bactérias, leveduras e bolores. Ao contrário dos quimioterápicos sintéticos, não há muitos registros na literatura sobre os possíveis mecanismos de ação dos ativos originários de plantas. Esses ativos podem atuar ativando enzimas no metabolismo intermediário, alterando a ação de inibidores que influenciam os nutrientes do meio, inferindo nos processos enzimáticos em nível nuclear ou ribossomal, provocando alterações nas membranas ou ainda interferindo no metabolismo secundário (VOLPATO, 2005).

Em seu estudo Garvil et al. (2013) obtiveram resultados satisfatórios com o óleo de *Melaleuca alternifolia* popularmente conhecido como Melaleuca, comprovando a sua eficácia como agente antimicrobiano, tanto contra os bacilos Gram-negativos, como contra os cocos Gram-positivos. O método de avaliação usado foi a difusão em ágar, que comprovou a sensibilidade de *E. coli* e *S. aureus* que apresentaram um halo de inibição de 4 cm frente ao OE de *M. alternifolia*. A constituição química do óleo essencial de *M. alternifolia* é bastante conhecida, sendo este rico em terpinen-4-ol (44,9%), este constituinte é o principal responsável por suas propriedades medicinais, especialmente antifúngicas e antibacterianas.

Pereira et al. (2008), concluíram em seus resultados dos testes *in vitro* que os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão), *Origanum vulgare* (orégano) e *Syzygium aromaticum* (cravo-da-índia) promoveram efeito inibitório sobre a *E. coli*. O óleo de *S. aromaticum* apresentou melhor atividade em menores concentrações, halo de inibição de 0,8 cm na concentração de 0,1%, enquanto que os óleos de *C. citratus* e *O. vulgare* apresentaram na mesma concentração halos de 0,7cm e ausência de halo de inibição, respectivamente.

Hoferl et al. (2009) encontraram de médio a forte atividade antimicrobiana do OE de *O. vulgare* contra *Escherichia coli*, apresentando CIM de 6 ppm.

Romeo et al. (2008) estudaram o OE de *Rosmarinus officinalis* (alecrim), cuja composição química mostrou 1,8 cineol, cânfora e borneol e apresentou ação contra *Escherichia coli* em todas as concentrações testadas, 10%, 5%, 1%, 0,1% e 0,01%

Hammer, Carson e Riley, (1999) relataram atividade do *Thymus vulgaris* (tomilho) contra *Escherichia coli*, apresentando concentração inibitória mínima de 0,03% (v/v).

Xu et al., (2008) concluíram que o mecanismo de ação do carvacrol, oriundo da *Lippia graveolens* (orégano mexicano) contra *Escherichia coli* é o rompimento da membrana plasmática.

O OE de *Lippia grandis* (erva-do-marajó) inibiu o crescimento de estirpes de *E. coli* (ATCC 35218 e ATCC 25922), apresentando Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 1,15 µg/mL, com halo de inibição com média de 29,3 ± 2,3 mm e 22,7 ± 0,6 mm, para cada cepa, respectivamente. Foi evidenciado que o óleo essencial de *L. grandis* contém compostos químicos que poderiam ser importantes para o tratamento de infecções causadas por microrganismos, contribuindo para o desenvolvimento de estratégias que podem ser usadas pela indústria de alimentos (SARRAZIN et al., 2012).

Lippia origanoides (Kunth), conhecida no norte do Brasil como "salva-do-Marajó" e "alecrim-pimenta", é uma espécie arbustiva com um ciclo de vida perene, cujas partes aéreas são usadas na culinária como aromatizante de pratos regionais, em tratamento de distúrbios gastrointestinais, doenças respiratórias, e como um antisséptico para a boca e garganta irritada. Esta espécie é também chamada de orégano no México e usada como um substituto para *Lippia graveolens* (Kunth) e *Origanum vulgare*, o orégano mexicano e orégano, respectivamente. (PASCUAL et al., 2001; SANTOS et al., 2004; OLIVEIRA et al., 2007).

L. origanoides é um arbusto aromático, ereto e ramificado, que cresce até 3 metros de altura, pertencente à família Verbenaceae. Este arbusto tem folhas simples e opostas, de tamanhos variados, devido a possíveis adaptações fisiológicas e morfológicas em resposta à exposição à luz (PARRA e RODRIGUEZ, 2007).

Algumas espécies de *Lippia*, ao longo dos anos, têm apresentado problemas de nomenclatura botânica devido à dificuldade em torno da correta identificação, causando a utilização de diversas sinonímias para uma mesma espécie em artigos científicos (PASCUAL et al., 2001). *L. origanoides* foi recentemente reclassificada e agora pertence a um grupo que inclui várias espécies com semelhanças morfológicas. Quatro grupos podem ser distinguidos e um deles que é dirigido por *L. origanoides* em que 28 táxons têm sido considerados como sinônimos, incluindo *L. sidoides*, *L. affinis*, *L. graveolens*, *L. salviifolia*, reconhecidos por seus usos tradicionais (O'LEARY et al., 2012).

A composição química de óleos essenciais de *Lippia* spp. é também determinada por fatores genéticos e outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários de tais plantas, como disponibilidade de água, luminosidade, temperatura, estágio de desenvolvimento da planta e seu estado nutricional. No entanto, as atividades biológicas atribuídas à espécie variam de acordo com constituição química do seu óleo essencial, podendo ocorrer divergência genética dentro de uma mesma população (VELA; ÁVILA; SANCHEZ, 2013).

O OE de *L. organoides* possui como principais componentes os monoterpenos oxigenados, o timol e o carvacrol (OLIVEIRA et al., 2006), que são responsáveis pelo cheiro característico e têm forte ação antimicrobiana contra fungos e bactérias (CARVALHO et al., 2003).

No estudo de Souza (2015) a composição química do OE de *L. organoides* determinou que o carvacrol foi o composto majoritário na maioria das plantas estudadas na estação seca ou chuvosa.

Utilizando a técnica de Disco difusão, Souza et al., (2015) a partir de seus resultados constaram que o OE extraído de *Lippia organoides* apresentou resultados que indicam um efeito inibitório mais efetivo sobre *E. coli* quando comparado a bactéria *Staphylococcus aureus*, obtendo a CIM de 40 µL/mL para ambas as cepas e CBM de 160 µL/mL frente a *E. coli*, não sendo identificado a CBM frente a *Staphylococcus aureus* nas concentrações do estudo (40, 80 e 160 µL/mL).

O OE de *Lippia organoides* foi submetido a ensaios antimicrobianos para determinação da CIM e da CBM (Concentração Bactericida Mínima). Os resultados mostraram que a dose de 120µl/mL foi eficiente em inibir o crescimento dos microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella Choleraesuis* (ATTCC 10708). As concentrações testadas não induziram alterações significativas no peso, no comportamento dos animais e nos parâmetros hematológicos e bioquímicos. Também não houve presença de alterações histopatológicas no fígado, rins e coração sugerindo que o óleo de *Lippia organoides* é atóxico após administração oral em condições agudas ou crônicas e sua utilização na medicina veterinária deve ser considerada como uma grande viabilidade econômica e sustentável (ANDRADE et al., 2014).

Santos et al. (2004) concluíram que o OE de *L. organoides* apresentou atividade antimicrobiana significativa contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida tropicalis* com halos de inibição de 15cm, 15 cm, 21 cm, 23cm e 27

cm, respectivamente. A análise da composição química do óleo demonstrou que o carvacrol foi o principal componente juntamente com o G-terpineno, timol, e p-cimeno.

No cenário de compostos naturais com potencial antimicrobiano, destaca-se a *Agave sisalana* (Perrine), conhecida popularmente como sisal é uma cultura de grande importância no Brasil (SILVEIRA et al., 2012). Produzida em larga escala no nordeste brasileiro, principalmente no Estado da Bahia, que é responsável por 95% da produção nacional de fibras duras, gerando empregos para mais de 800 mil pessoas (SANTOS et al., 2010). Na composição química da *A. sisalana* encontra-se tanino, alcalóides, saponina e cumarina (BARRETO; ARAÚJO; BONIFÁCIO, 2010).

O extrato de *A. sisalana* apresenta atividade antimicrobiana comprovada, Almeida (2013) detectou uma CIM de 98 µg/mL para *Candida albicans*, 783 µg/mL para *Tricophyton mentagrophytes* e 3125 µg/mL para *Malassezia pachydermatis*.

Nos testes *in vitro* com *A. sisalana* encontrou-se redução superior a 95% na contagem de larvas de terceiro estágio (L3) do gênero *Haemonchus* spp. nas concentrações entre 86,5 e 146,3 mg/mL, e de 95% para *Oesophagostomum* spp. na concentração de 146,3 mg/mL, concluindo que o tratamento a partir do extrato de *A. sisalana* resulta na redução significativa ($p < 0,05$) do número de larvas (DOMINGUES et al., 2010).

Os extratos da *A. sisalana* impediu a germinação de conídios *Fusarium oxysporum* e o crescimento micelial na concentração de 40 %. A aplicação do extrato em solo fértil em época pós-plantio reduziu a incidência de plantas afetadas (MORAIS et al., 2010).

A literatura mostra que o extrato de *Agave sisalana* tem comprovada ação antifúngica, porém com poucos estudos tem sido realizado com bactérias, fomentando a necessidade de avaliar a sua eficácia como antibacteriano.

Neste contexto, a indústria de alimentos busca opções de substituição dos métodos tradicionais de controle de microrganismos nos alimentos, e, dentre os mais estudados, estão a utilização de compostos antimicrobianos naturais (SANTOS, 2010).

Salienta-se a necessidade de realizar estudos consistentes nessa área, com vistas a redução da resistência bacteriana por meio de alternativas que substituam as terapêuticas atualmente utilizadas, e associação com novas estratégias para redução de contaminante como no uso em embalagens. Conferindo interesse ao uso de antimicrobianos naturais, por ser uma alternativa economicamente viável para se assegurar a qualidade microbiológica deste produto e proporcionar uma segurança para a saúde do consumidor associado a importância da fiscalização pelos órgãos competentes e a sensibilização dos

consumidores no que tange o manuseio higiênico e a cocção adequada, medidas eficientes para eliminar patógenos alimentares.

REFERÊNCIAS

ABEF. Associação Brasileira de Produtores e Exportadores de Frangos. Apresenta informações sobre a avicultura do Brasil e sobre a entidade. Disponível em: <http://www.abef.com.br/site1/anoario/2009/revista_digital/Proro%20Version/Main.php>.

Acesso em: 30 set. 2014.

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual de Atividades 2014. Disponível em:<http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf>.

Acesso em: 13 jan 2016.

AJIBOYE, R. M.; SOLBERG, O. D.; LEE, B. M.; RAPHAEL, E.; DEBROY, C.; RILEY, L. W. Global spread of mobile antimicrobial drug resistance determinants in human and animal *Escherichia coli* and *Salmonella* strains causing community-acquired infections. **Clinical Infectious Diseases**, v.49, n.3, p.365-371, ago., 2009.

ALBINO, L. F. T.; FERES, F. A.; DIONÍZIO, M. A.; ROSTAGNO, H. S.; VARGAS JÚNIOR, J. G.; CARVALHO, D. C. O.; GOMES, P. C.; COSTA, C. H. R. Uso de prebióticos a base de mananoligossacarídeo em rações para frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v.35, n.3, p.742-749, 2006.

ALMEIDA, E. C. S. L. **Ação antifúngica do resíduo líquido integral e fracionado do desfibramento da folha do sisal (*Agave sisalana*) sobre *Malassezia pachydermatis*, *Tricophyton mentagrophytes* e *Candida albicans***. 2013. 94 f. Dissertação - (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro, 2013. Disponível em: <<http://base.repositorio.unesp.br/handle/11449/95035>>. Acesso em 14 set 2014.

ANDRADE, C. L.; FERREIRA, G. B.; FRANCO, R. M.; NASCIMENTO, E. R.; TORTELLY, R. Alterações patológicas e identificação da *Escherichia coli* como agente causal da

celulite aviária em frangos de corte inspecionados em um matadouro de São Paulo. **Rev. bras. Ciências Vet.**, v. 13, n. 3, p. 139-143, set-dez. 2006.

ANDRADE, V. A.; ALMEIDA, A. C.; SOUZA, D. S.; COLEN, K. G. F.; MACEDO, A. A.; MARTINS, E. R.; FONSECA, F. S. A.; SANTOS, R. L.; Atividade antimicrobiana, toxicidade aguda e crônica do óleo essencial de *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 12, p. 1153-1161. 2014.

ANDREATTI FILHO, R.L. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2006, 314p.

ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Rev., Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 2, p. 775-790. 2012.

AYRES, M. C. C; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Rev. Bras Farmacognosia**, v. 18, p. 90-97, 2008.

BARCELOS, A. S.; FLÔRES, M. N.; KOMMERS, G. D.; NASCIMENTO, V. P.; SEGABINAZI, S. D.; ANTONIAZZI, T.; BASSAN, J. D. L. Macroscopia, histopatologia e bacteriologia de fígados de frangos (*Gallus gallus*) condenados no abate. **Ciência Rural**, v. 36, n. 2, p. 561-567, 2006.

BARRETO, A. F.; ARAÚJO, E.; BONIFÁCIO, B. F. Eficiência de extratos de *Agave sisalana* (Perrine) sobre o ácaro rajado *Tetranychus urticae* (Koch) e ocorrência de fitotoxidez em plantas de algodoeiro (*Gossypiumhirsutum* L. r *latifolium* Hutch). **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 5, p. 207-215, 2010.

BARROS, L. S. S. et al. A Avicultura brasileira e sua afinidade com a celulite aviária. **Arquivos de Pesquisa Animal**. Cruz das Almas, v.1, n.2, p.78-97, 2012.

BENÍCIO, L. A. S. Painel – Restrições e uso de aditivos (promotores de crescimento) em ração de aves. Visão da indústria. In: Conferência APINCO'1996 de Ciência e Tecnologia Avícolas, Curitiba, 15 a 17 de outubro de 1996. p.17-26.

BERTINI, L. M.; PEREIRA, A. F.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, A.; MORAIS, S. M.; CUNHA, F. A.; CAVALCANTI, E. S. B. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 34, p. 80-83. 2005.

BOGAARD, A. E. V. D.; LONDON, N.; DRIESSEN, C.; STOBBERINGH, E. E. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers e poultrys laughters. **Journal Antimicrobiol Chemotherapy**, v.47, p.763-771, 2001.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº. 13/04. Regulamento técnico sobre aditivos para produtos destinados à alimentação animal. Diário Oficial da União, Brasília-DF, 01 dez. 2004, Seção 1, p. 63.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria nº 210 de 10 de novembro de 1998. Aprova o Regulamento Técnico da Inspeção Tecnológica e Higiénico-Sanitária de Carne de Aves. 26 nov. 1998. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consultarLegislacao.do>>. Acesso em: 20 nov. 2014.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Relatório Técnico. Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no 40, de 08 de janeiro de 2006.

BRASIL. Resolução RDC ANVISA/MS nº. 12, de 02 de janeiro de 2001. Regulamento Técnico sobre os Padrões Microbiológicos para Alimentos. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 10 jan. 2001. Seção 1.

BRITO, B. G.; TAMEHIRO, C. Y.; OKANO, W.; LUZARDO, M. M.; BERBEL, M. M.; GUIMARAES, I. G. Celulite cervical em frangos de corte causada por *Escherichia coli*. **Ciências Agrárias**, Londrina, v. 23, n. 1, p. 81-84, jan./jun. 2002.

BRUGALLI, I. Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal. In: SIMPÓSIO SOBRE MANEJO E NUTRIÇÃO DE AVES E SUÍNOS, 2003, Campinas, SP. **Anais...** Campinas: Colégio Brasileiro de Nutrição Animal. v.1, p.167-182. 2003.

CARDOSO, A. L. S. P.; CASTRO, A. G. M.; TESSARI, E. N. C.; BALDASSI, L.; PINHEIRO, E. S. Pesquisa de *Salmonella* spp., coliformes totais, coliformes fecais, mesófilos, em carcaças e cortes de frango. **Hig Alim.** v. 19, n.128, p. 144-150, 2005.

CARVALHO, A. F. U.; MELO, V. M. M.; CRAVEIRO, A. A.; MACHADO, M. I. L.; BANTIM, M. B.; RABELO, E. F. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. against *Aedes aegypti* Linn. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 98, n.4, p. 569-571. 2003. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12937776> Acesso em: 25 abr.2014.

CARVALHO, A. C. F. B.; CORTEZ, A. L. L., SALOTTI, B. M.; BURGER, K. P; MARTINS, A. M. C. V. Presença de microrganismos mesófilos, psicrotróficos e coliformes em diferentes amostras de produtos avícolas. **Arq. Inst. Biol.**, São Paulo, v.72, n.3, p.303-307, jul.-set., 2005.

CAPROLI, A.; MORABITO, S.; BRUGERE, H.; OSWALD, E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. **Vet. Res**, v. 36, p. 289-311, 2005.

COLUSI, A. D. Uso racional de antimicrobianos y quimioterápicos en avicultura. In: Conferência 93 APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas. FACTA, Santos, 1-3 de junho de 1993, p.67-81.

CONNOLLY, A. Reagindo ao desafio da retirada dos antibióticos promotores de crescimento das rações e a forma como os oligossacarídeos específicos assumiram a dianteira. **Feed Compounder**, v.6, p.20-25, 2001.

COSTALUNGA, S.; TONDO, E. C. Salmonellosis in Rio grande do Sul, Brasil, 1997 to 1999. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 342-346, 2002.

DALOLIO, F. S.; MOREIRA, J.; VALADARES, L. V.; NUNES, P. B.; VAZ, D. P.; PEREIRA, H. J.; PIRES, A. V.; CRUZ, P. J. Aditivos alternativos ao uso de antimicrobianos na alimentação de frangos de corte. **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável.** v. 5, n. 1, p. 86-94, 2015.

DELICATO; E. R.; BRITO, B. G.; GAZIRI, L. C.; VIDOTTO, M. C. Virulence-associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**. v. 94, p. 97-103. 2003.

DOMINGUES, L. F.; BOTURA, M. B.; CRUZ, A. C. G.; YUKI, C. C.; SILVA, G. D.; COSTA, M. S.; MURPHY, G.; MOREIRA, E. L. T.; MENESES, I. D. S.; ALEMEIDA, M. G. A. R.; BRANCO, A.; ALMEIDA, M. A. O.; BATATINHA, M. J. M. Evaluation of anthelmintic activity of liquid waste of *Agave sisalana* (sisal) in goats. **Rev. Bras. Parasitol. Vet. (Online)** v.19, n.4, p. 270-272. 2010.

DOYLE, M.; SCHOENIJ, L. Isolation of *Escherichia coli* 0157:H7 from Retail Fresh Meats and Poultry. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 53, n.10, p.2394-2396. 1987.

DZIVA, F.; STEVENS, M. P. Colibacillosis in poultry: unraveling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. **Avian Pathol.** v. 37, n. 4, p. 355-366. 2008. doi: 10.1080/03079450802216652. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18622850>> Acesso em 19 nov 2015.

ELPO, E. R. S.; NEGRELLE, R. R. B.; GOMES, E. C. Avaliação da qualidade microbiológica do gengibre "in natura" comercializado na região metropolitana de Curitiba, Pr. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 2, p. 139 -146. 2004

FARIA, D. E.; HENRIQUE, A. P. F.; FRANZOLIN NETO, R.; MEDEIROS, A. A.; JUNQUEIRA, O. M.; FARIA FILHO, D. E. Alternativas ao uso de antibióticos como promotores de crescimento para frangos de corte: Ácidos orgânicos e probióticos. **Ciência Animal Brasileira** v. 10, n. 1, p. 29-39, 2009.

FERNANDES, F. C.; FURLANETO, A. Riscos Biológicos em Aviários. **Rev. Bras. Med. Trab.**, Belo Horizonte. v. 2, n. 2, p. 140-152, 2004.

FERREIRA, A. J. P.; KNOBL, T. Colibacilose aviária. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; MACARI, M. **Doença das Aves**. Campinas: FACTA, p. 197-207, 2000.

FIORENTIN, L. Reutilização da cama na criação de frangos de corte e as implicações de ordem bacteriológica na saúde humana e animal. 23p. **Embrapa Suínos e Aves**. Documentos, 94). Concórdia: 2005.

FRANCO, B. D. G.; LANGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008.

FRASÃO, B. S.; CORTES, L. R.; NASCIMENTO, E. R.; CUNHA, N. C.; ALMEIDA, V. L.; AQUINO, M. H. C. Detecção de resistência às fluoroquinolonas em *Campylobacter* isolados de frangos de criação orgânica. **Pesq. Vet. Bras.** v. 35, n. 7, p. 613-619. 2015.

GAMA, N. M. S. Q.; TOGASHI, C. K.; FERREIRA, N. T.; BUIM, M. R.; GUASTALLI, E. L.; FIAGA, D. A. M. Conhecendo A Água Utilizada para as Aves de Produção **Biológico**, São Paulo, v.70, n.1, p.43-49. 2008.

GARCIA, R. G.; LIMA, I. C.; CALDARA, R. F. Papel da cama na produção e no bem estar de frangos de corte. **Revista do Avisite**, Campinas, v.5, n.47, p. 46-50, 2011.

GARVIL, M. P.; ROSA, G. A. A.; SILVA, R. B.; SILVEIRA, A. P. AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE MELALEUCA (*Melaleuca alternifolia*). **E-RAC**, v. 3, n. 1, p. 149-165. 2013. Disponível em: < <http://www.computacao.unitri.edu.br/erac/index.php/erac/article/view/119>> Acesso em: 29 maio 2014.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos**. 4. ed. Barueri: Manole, 1034p., 2011.

GIOTTO, D. B. **Análise temporal e espacial de condenações de frangos de corte em matadouro-frigorífico**. 2008. 115f. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2008.

GOMIDE, L. A. M.; RAMOS, E. M., FONTES, P. R. **Tecnologia de abate e tipificação de carcaças**. Viçosa: Ed. Viçosa, 370p., 2006.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY T. V. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. **J Appl Microbiol.** v. 86, p. 985 – 990. 1999.

HAMMERUM, A. M.; HEUER, O. E. Human health hazards from antimicrobial-resistant *Escherichia coli* of animal origin. **Clin. Infect. Dis.** Chicago, v.48, n.7, p.916-921, abr. 2009.

HOFERL, M.; BUCHBAUER, G.; JIROVETZ, L.; SCHMIDT, E.; STOYANOVA, A.; DENKOVA, Z.; SLAVCHEV, A.; GEISLER, M. Correlation of antimicrobial activities of various essential oils and their main aromatic volatile constituents. **Journal of Essential Oil Research**, v.21, p.459-464, 2009.

ITO, N. M. K.; MJYAJI, C. I.; MJYAJI, S. O. Diagnóstico diferencial das enfermidades bacterianas, fúngicas e parasitárias que acometem os frangos de corte. Cascavel, PR: Coluna do Saber, 160p., 2007.

JACOBSEN, G. **Condenações por síndrome ascítica em frangos abatidos sob Inspeção Federal entre 2002 e 2006 no estado do Rio Grande do Sul e sua repercussão econômica.** 2007. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária), Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2007.

JAY, J. M. Indicators of food microbiological quality and safety. In: Modern food microbiology. 6.ed. Maryland: Aspen Publication, 2000. p.387-407.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos.** 6 ed. São Paulo: Artmed, 2005. 711p.

JOHNSON, T. J.; WANNEMUEHLER, Y.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, S. J.; ROSENBERGER, S. C.; NOLAN, L. K. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 12, p. 3987–96, 2008. Disponível em: <<http://jcm.asm.org/content/46/12/3987.short>> Acesso em 19 nov 2015.

KAPER, J. B. Pathogenic *Escherichia coli*. **Int. J. Med. Microbiol.**, v. 295, p. 355-356, 2005.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J.; NYCHAS, G. J. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, p. 453 - 462, 2001. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x/abstract>>. Acesso em: 28 jan. 2014. doi: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x.

LEE, G. Y.; JANG, H. I.; HWANG, I. G.; RHEE, M. S. Prevalence and classification of pathogenic *Escherichia coli* isolated from fresh beef, poultry, and pork in Korea. **Int. J. Food Microbiol.**, v.134, p.196-200, 2009.

LEITE, A. M. O.; FRANCO, R. M. Coliformes totais e *Escherichia coli* em coxas de frango comercializados no Rio de Janeiro. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 13, n. 2, p. 80-83, 2006.

MANTILLA, S.; FRANCO, R.; OLIVEIRA, L.; SANTOS, E.; GOUVÊA, E. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. isoladas de carne moída bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 45, n. 2, p. 116-121, 2008.

MASCHIO, M. M.; RASZL, S. M. Impacto financeiro das condenações post-mortem parciais e totais em uma empresa de abate de frango. **E-tech: Tecnologias para Competitividade Industrial**, Florianópolis, n. esp. alimentos, p. 26-38, 2012. Disponível em: <[http:// revista.ctai.senai.br/index.php/edicao01/article/ viewPDFInterstitial/208/105](http://revista.ctai.senai.br/index.php/edicao01/article/viewPDFInterstitial/208/105)> Acesso em: 12 abr. 2015.

McMULLIN, P. Produção avícola após redução do uso de antimicrobianos. Riscos, potencial de contaminação cruzada e detecção de resíduos. North Yorkshire, U.K., 2004. In: CONFERÊNCIA APINCO, 2, 2004, Campinas SP. **Anais...** Campinas: FACTA, v 2. p.219. 2004

MENG, J.; FENG, P.; DOYLE, M. P. Pathogenic *Escherichia coli*. In: DOWNES, F.P.; ITO, K. Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. 4. ed. Washington, DC: **American Public Health Association (APHA)**, 676p, Cap.35, p.331-341. 2001.

MORAIS, M. S.; ARAÚJO, E.; ARAÚJO, A. C.; BELÉM, L. F. Eficiência dos extratos de alho e agave no controle de *Fusarium oxysporum* S. **Rev. Bras. de Agroecologia**. v. 5, n. 2, p. 89-98. 2010. Disponível em: <<http://www.aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/rbagroecologia/article/view/9580/6700>>. Acesso em 24 set. 2014.

MOTA, R. A.; SILVA, K. P. C.; FREITAS, M. F. L.; PORTO, W. J. N.; SILVA, L. B. G. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição à multirresistência bacteriana. **Braz. J. Vet. Res. Anim. Sci.**, v.42, p.465-470, 2005.

MOULIN-SCHOULEUR, M.; REPERANT, M.; LAURENT, S.; BREE, A.; MIGNON-GRASTEAU, S.; GERMON, P.; RASSCHAERT, D.; SCHOULER, C. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* Strains of Avian and Human Origin: Link Between Phylogenetic Relationships and Common Virulence Patterns. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, p. 3366–3376, 2007.

NAKAZATO, G.; CAMPOS, T. A.; STEHLING, E. G.; BROCCHI, M.; SILVEIRA, W. D. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli*(APEC). **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v.29, n.7, p.479-486, julho, 2009.

NOLAN, L. K.; BARNES, H. J.; VAILLANCOURT, J.R.; ABDUL, T. A.; LOGUE, C. M. Colibacillosis. In: SWAYNE, D. E.; GLISSON, J. R.; MCDUGALD, L. R., NOLAN, L. K., SUAREZ, D. L., NAIR, V. L. (Eds.), **Diseases of Poultry**, Wiley-Blackwell: Georgia, p. 1408, 2013.

O'LEARY, S. N. S.; DENHAM, F.; SALIMENA; M. E. Species delimitation in *Lippia* section *Goniosta chyum* (Verbanaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of Linnean Society**, v.170, p. 197-219, 2012. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1095-8339.2012.01291.x/abstract> Acesso em: 05 fev. 2016.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, D. S.; ALVIANO, C. S.; LEITÃO, S. G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chem.** v. 101, p. 236–240. 2007.

OLIVEIRA, D. R.; LEITÃO, G. G.; SANTOS, S. S.; BIZZO, H. R.; LOPES, D.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; S. G. LEITÃO. J. Ethn pharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná, Brazil. **Ethnopharmacol.** v. 108, n. 1, p. 103-108. 2006. Disponível em: <ftp://www.ufv.br/DBG/Filogenia_molecular/usuarios/karla/Lyderson/2010/artigos/quimica/Oliveira2006.pdf> Acesso em: 26 nov. 2015

OLIVEIRA, F. A.; SALVADOR, F. C. Determinação da contaminação microbiológica da carne de frango comercializada na cidade de Apucarana e Califórnia – PR. **Revista F@ciência**, Apucarana, v.8, n.15 p.159-171, 2011.

PARRA, E. T.; RODRIGUEZ, N. L. Plasticidad fenotípica de *Lippia alba* y *Lippia origanoides* (Verbenaceae) em resposta a la disponibilidad de luz. **Acta Biologica Colombiana.** v. 12, p. 91–102. 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.org.co/pdf/abc/v12s1/v12s1a7.pdf> >Acesso em: 07 jun.2014.

PASCHOAL, E. C.; OTUTUMI, L. K.; SILVEIRA, A. P. Principais causas de condenações no abate de frangos de corte de um abatedouro localizado na região noroeste do Paraná, Brasil. **Arq. Ciênc. Vet. Zool.** v. 15, n. 2, p. 93-97, jul./dez. 2012.

PASCUAL, M. E.; K. SLOWING, E. CARRETERO, D. SÁNCHEZ MATA, A. VILLAR, J. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J. Ethnopharmacol.** v. 76, n. 3, p. 201-14. 2001.

PENTEADO, F. R.; ESMERINO, L. A. Avaliação da qualidade microbiológica da carne de frango comercializada no município de Ponta Grossa – Paraná. **Biol. Health Sci.**, Ponta Grossa. v. 17, n. 1, p. 37-45, 2011.

PEREIRA, A. A.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARAES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciênc. agrotec.**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun., 2008.

PONTES, A. P. programa de controle de *Salmonella* em abatedouros de aves. In: CONFERÊNCIA APINCO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AVÍCOLA, 2004. Santos, SP. **Anais...**São Paulo: Fundação Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2004. p. 102.

ROCHA, A. C. G. P. **Utilização de Inteligência Artificial (Redes Neurais Artificiais) para a Classificação de Patogenicidade de Amostras de *Escherichia coli* isoladas de frango de corte.** Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias), Universidade Federal Do Rio Grande Do Sul, Porto Alegre, 2006.

RODRIGUES, A. C. A.; PINTO, P. S. A.; VANETTI, M. C. D.; BEVILACQUA, P. D.; PINTO, M. S.; NERO, L. A. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 38, n.7, p.1948-1953, out. 2008.

RODRIGUEZ-SIEK, K. E.; GIDDINGS, C. W.; DOETKOTT, C.; JOHNSON, T. J.; FAKHR, M. K.; NOLAN, L. K. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection and avian colibacillosis. **Microbiology**, v.151, p.2097-2110, 2005.

ROMEO, F. V.; LUCA, S.; PISPOCO, A.; POIANA, M. Antimicrobial Effect of Some Essential Oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20 p. 373-379, 2008.

RON, E. Z. Host appecificity of septicemic *Escherichia coli*: human and avian pathogens. **Curr. Opinion Microbiol.**, v. 9, p. 28-32, 2006.

SANTANA, A. P.; MURATA, L. S.; FREITAS, C. G.; DELPHINO, M. K.; PIMENTEL, C. M. Causes of condemnation of carcasses from poultry in slaughterhouses located in state of Goiás, Brasil. **Ciência Rural**, v. 38, n. 9, p. 2587-2592, 2008.

SANTOS, F. J.; LOPES, J. A.; CITO, G. L.; OLIVEIRA, E. H.; LIMA, S. G.; REIS, F. A. M. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia organoides* H.B.K. **J Essen Oil Res.** v. 16, p. 504-506, 2004.

SANTOS, J. C.; **Avaliação do efeito antimicrobiano de óleos essenciais sobre microrganismos patogênicos em vôngole (*Anomalocardia brasiliiana*).** 2010. Tese (Mestrado em Ciência dos Alimentos) Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010.

SANTOS, M. B.; SANTOS, C. Y.; ALMEIDA, M. A.; SANTOS, C. R. S.; SANT'ANNA, H. L. S.; SANTOS, O. S. N.; SILVA, F.; MARTINS, G. N. Efeito inibitório in vitro de extrato vegetal de *Allium sativum* sobre *Aspergillus Níger* Tiegh. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, SP, v.12, n.1, p.13-17, 2010.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. Porto Alegre: UFSC, p. 1102, 2004.

SARRAZIN, S. L. F.; OLIVEIRA, R. B.; BARATA, L. E. S.; MOURAO, R. H. V. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**. v. 134, n. 3, p. 1474-1478, 2012.

SILVA, I. M. M.; BALIZA, M.; SANTOS, M. P.; REBOUÇAS, L. T.; ROCHA, E. V. S.; SANTOS, V. A.; SILVA, R. M.; NETO EVÂNCIO, J. Presença de *Escherichia coli* em fígados de frangos provenientes de matadouros avícolas. **Rev. Bras. Saúde Prod. Anim.**, Salvador, v. 13, n. 3, p. 694-700 jul./set., 2012.

SILVA, I. M. M. **Caracterização anátomo-histopatológica de fígados de frango contaminados por *Escherichia coli* provenientes de matadouros avícolas da Bahia**. 2009. Tese (Doutorado em Ciência Veterinária), Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinária, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

SILVA, M. C. **Avaliação da qualidade microbiológica de alimentos antes e após a implementação de boas práticas de fabricação em agroindústrias da região extremo oeste catarinense**. 2002. 75p. Dissertação (Mestrado em Ciências), Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2002.

SILVA, R. M. **Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* proveniente de lesões de celulite de frangos de corte**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2011.

SILVA, V. S.; RECH, D. V.; COLDEBELLA, A.; BOSETTI, N.; AVILA, V. S. Efeito de Tratamentos Sobre a Carga Bacteriana de Cama de Aviário Reutilizada em Frangos de Corte. Comunicado Técnico 467, MAPA, Concórdia, 1ªEd. SC, 2007.

SILVEIRA, R. X.; CHAGAS, A. C. S.; BOTURA, M. B.; BATATINHA, M. J. M.; KATIKI, L. M.; CARVALHO, C. O.; BEVILAQUA, C. M. L.; BRANCO, A.; MACHADO, E. A. A.; BORGES, S. L.; ALMEIDA, M. A. O. Action of sisal (*Agave sisalana* Perrine) extract in the in vitro development of sheep and goat gastrointestinal nematodes. **Experimental parasitology**, v. 131, n. 2, p. 162-168, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C.M.O. et al., Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS/UFSC, Cap.18. 2000.

SOARES, L. L. P. Painel – Restrições e uso de aditivos (promotores de crescimento) em ração de aves. Visão do fabricante. In: Conferência APINCO'1996 de Ciência e Tecnologia Avícolas, Curitiba, 15 a 17 de outubro de 1996. p.27-36.

SOUZA, D. S.; ALMEIDA, A. C.; ANDRADE, V. A.; MARCELO, N. A.; AZEVEDO, I. L.; MARTINS, E. R.; FIGUEIREDO, L. S. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* e *Lippia rotundifolia* frente a enterobactérias isoladas de aves. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v. 67, n. 3, p. 940-944, 2015.

SOUZA, L. F. A.; ARAÚJO, D. N.; ASTOLPHI, J. L. L.; DIAS, L. B. M.; AMBIEL, A. C.; SANTOS, L. S.; CARMO, A. J.; SILVA, P. C. G. Probiótico e antibiótico como promotores de crescimento para frangos de corte. *Colloquium Agrariae*, v. 6, n. 2, p. 33-39, 2010.

SOUZA, L. M. **Flavonoides totais, atividade antioxidante e variação sazonal da composição química do óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia origanoides* Kunth.)**. 2015. Dissertação (Mestrado em Produção Animal), Universidade Federal de Minas Gerais, Montes Claros, 2015.

TOLEDO, G. S. P.; COSTA, T. C. C.; SILVA, L. P.; PINTO, D.; FERREIRA, P., POLETTO, C. J. Desempenho de frangos de corte alimentados com dietas contendo antibiótico e/ou

fitoterápico como promotores, adicionados isoladamente ou associados. **Rev Cienc. Rural.** v. 37, n. 6, p. 1760-1764, nov-dez, 2007.

VAILLANCOURT, J. P.; H. J. BARNES. Coliform cellulitis (inflammatory process). In: SAIF, Y. M.; BARNES, H. J.; GLISSON, J. R.; FADLY, A. M.; McDOUGALD. L. R.; SWAYNE, D.E. **Diseases of poultry**. Ames: Iowa State University Press, p. 652–656, 2003.

VELA, V. N. E.; AVILA, D. W. A., SANCHEZ, C. M. I. Genetic structure and essential oil diversity of the aromatic shrub *Lippia origanoides* Kunth (Verbenaceae) in two populations from northern Colombia. **Agron. Colomb**, vol. 31, n. 1, p. 517, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?pid=S0120-99652013000100002&script=sci_arttext> Acesso em: 22 nov.2015.

VICENTE, C.; BOERLIN, P.; DAIGNAULT, D.; DOZOIS, C. M.; DUTIL, L.; GALANAKIS, C.; SMITH, R. J. R.; TELLIER, P. P.; TELLIS, P. A.; ZIEBELL, K.; MANGES, A. R. Food reservoir for *Escherichia coli* causing urinary tract infections. **Emerging Infectious Diseases**, v. 16, n. 1, Jan., 2010.

VIEIRA, T. B. **Caracterização de *Escherichia coli* isolados de miúdos e carcaça com celulite por RAPD e detecção dos genes *iss* e *felA* por PCR**. 2010. 106f. Tese (Doutorado em Higiene Veterinária e Processamento Tecnológico de Produtos de Origem Animal), Pós-Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal Fluminense, Niterói, Rio de Janeiro, 2010.

VIEIRA, T. B.; FRANCO, R. M.; MAGALHÃES, H.; PRAXEDES, C. I. S.; TORTELLY, R. Celulite em frangos de corte abatidos sob inspeção sanitária: aspectos anatomopatológicos associados ao isolamento de *Escherichia coli*. **Rev. bras. Cienc.Vet.**, v. 13, n. 3, p. 174-177, set.-dez. 2006.

VOLPATO, A. M. M. **Avaliação do potencial antibacteriano de *Calendulaofficinalis* (Asteraceae) para seu emprego como fitoterápico**. Tese (Doutorado em Ciências), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

WHO 2013. Anti-microbial resistance. Disponível em <<http://www.who.int/trade/glossary/story004/en/>> Acesso em 13 jan. 2016.

XU, J.; ZHOU, F.; JI, B. P.; PEI, R. S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, p. 174-179, 2008.

ZANATTA, G. F.; KANASHIRO, A. M. I.; CASTRO, A. G. M.; CARDOSO, A.L.S.P.; TESSARI, E.N.C.; PULICI, S.C.P. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 71, n. 3, p. 283-286, 2004.

CAPÍTULO 2

PRESENÇA DE COLIFORMES TOTAIS E *Escherichia coli* EM AMBIENTE E INSUMOS DE AVIÁRIOS ASSOCIADOS A FATORES DE VIRULÊNCIA.

PRESENÇA DE COLIFORMES TOTAIS E *Escherichia coli* EM AMBIENTE E INSUMOS DE AVIÁRIOS ASSOCIADOS A FATORES DE VIRULÊNCIA.

COLIFORMS TOTAL ATTENDANCE AND *Escherichia coli* ENVIRONMENTAL AND INPUTS AVIARIES VIRULENCE FACTORS.

Lívia Souza Guimarães Rocha e Silva⁽¹⁾, Paulo José Lima Juiz⁽²⁾, Ricardo Mendes da Silva⁽²⁾, Gabrielly Sobral Neiva⁽¹⁾, Maykson Costa de Jesus⁽¹⁾, Isabella de Matos Mendes da Silva⁽²⁾

1 - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Rua Rui Barbosa, 710 - Campus Universitário CEP 44380-000, Cruz das Almas/BA. lr.liviarocha@gmail.com, ricardomendes@ufrb.edu.br, neiva.gs@hotmail.com, mayk_costa@hotmail.com

2 - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências da Saúde. Avenida Carlos Amaral, 1015 - Cajueiro, Santo Antônio de Jesus/BA, CEP 44.570-000. isabellamatos@ufrb.edu.br, paulojuiz@ufrb.edu.br

Abstract

The aim of this study was to determine the population of total coliforms and *Escherichia coli* (*E. coli*) in environmental samples (bed) and inputs (water and food) of poultry in the slaughterhouse of Bahia Reconcavo and identify virulence genes *iss* and *iutA* the positive strains *E. coli*. In the period from July to December 2014 were collected in 7 aviaries 70 samples, including environment and inputs, it was found the population of Total Coliforms and *E. coli*, by rapid method of counting Petrifilm™ (3M Company) (998.8 AOAC) samples and the bed through feed and fast method chromogenic Readycult® (Merck) in water samples. Samples of *E. coli* were analyzed for the presence of virulence genes *iss* and *iutA*, using the Polymerase Chain Reaction (PCR). The Total Coliforms were detected in 82.85% of environmental samples and inputs, with between 1.48 to 8.40 log UFC/g. Strains of *E. coli* were present in the environment and inputs in 71.42% of samples, with between <0.95 to 7.79 log UFC/g. Among the samples of the environment and inputs the poultry, the bed is configured as larger population sample of *E. coli*, with a mean of 5.36 log UFC/g, then the trough of the feed samples (3.00 log UFC/g) depositing ration (2.60 log UFC/g). In the water cooler *E. coli* water was present in 78.57% of the samples. The *iutA* and *iss* genes were detected in 92.0 % and 34.0 % of the isolates of *E. coli*, respectively, yielding concomitantly the presence of virulence genes in 34.0 % of the isolates. Thus, considering the presence of virulence genes *iss* and *iutA* characteristic of Pathogenic *Escherichia coli* for Birds, in coming isolated from the environment and inputs of the aviaries of Bahia Reconcavo, it is emphasized that the implementation of effective techniques for health management in all stages of production of chicken meat that aim to avoid the disclosure of this and other pathogens aviaries to the consumer, ensuring safe food production.

Keywords: Poultry, zoonotic potential, APEC, Pathogenicity, avian bed, *iss*, *iutA*.

Resumo

Objetivou-se neste trabalho determinar a população de Coliformes Totais e *Escherichia coli* (*E. coli*) em amostras de ambiente (cama) e insumos (água e ração) de aviários em matadouro do Recôncavo da Bahia e identificar os genes de virulência *iss* e *iutA* nas cepas positivas para *E. coli*. No período de julho a dezembro de 2014 foram coletadas em 7 aviários 70 amostras, incluindo ambiente e insumos. Foi verificada a população de Coliformes totais e *E. coli*, pelo método rápido de contagem Petrifilm™ (3M Company), (AOAC 998.8) nas amostras de cama e

ração e por meio do método rápido cromogênico Readycult® (Merck) nas amostras de água. As amostras de *E. coli* foram analisadas quanto a presença dos genes de virulência *iss* e *iutA*, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Os Coliformes Totais foram detectados em 82,85% das amostras do ambiente e insumos, com população entre 1,48 a 8,40 log UFC/g. Cepas de *E. coli* estavam presentes em ambiente e insumos em 71,42% das amostras, com população entre <0,95 a 7,79 log UFC/g. Dentre as amostras do ambiente e insumos dos aviários, a cama configurou-se como a amostra de maior população de *E. coli*, apresentando média de 5,36 log UFC/g, seguida das amostras de ração do comedouro (3,00 log UFC/g) e ração do depósito (2,60 log UFC/g). Na água do bebedouro *E. coli* esteve presente em 78,57% das amostras. Os genes *iutA* e *iss* foram detectados em 92,0% e 34,0% dos isolados de *E. coli*, respectivamente, obtendo-se de forma concomitante a presença dos genes de virulência em 34,0% dos isolados. Desta forma, considerando a presença dos genes de virulência *iss* e *iutA*, característicos de *Escherichia coli* Patogênica para Aves, nos isolados oriundos do ambiente e insumos dos aviários do Recôncavo da Bahia, enfatiza-se a implantação de técnicas efetivas para o manejo sanitário, em todas as etapas do processo produtivo da carne de frango que visem evitar a veiculação deste e de outros patógenos do aviário para o consumidor, garantindo a produção segura do alimento.

Palavras-chave: Avicultura, Potencial zoonótico, APEC, Patogenicidade, Cama aviária, *iss*, *iutA*.

1. Introdução

No cenário mundial, o Brasil ocupa posição de destaque na produção de aves, considerado o principal exportador de carne de frango no mundo (ABPA 2015). Contudo, essa crescente demanda propicia a disseminação de microrganismos, que pode comprometer toda a cadeia produtiva, além de se configurar um risco potencial à saúde do consumidor (Barros et al. 2012).

De acordo as afirmações de Maschio & Raszl (2012), observa-se com frequência a ocorrência de lesões que levam a condenação de carcaças ou partes, durante as fases de criação dos frangos e a fase industrial, culminando em prejuízos para as empresas avícolas. Dados da literatura apontam o frango e seus derivados como importantes veículos de microrganismos patogênicos (Marques et al. 2010; Vaz et al. 2010; Prata 2008)

Neste contexto, a condenação parcial ou total de carcaças tem como objetivo zelar pela saúde pública, tendo em vista que os produtos de origem animal constituem a mais importante fonte de patógenos que podem ser veiculados para o ser humano (Silva & Vieira 2010). Estas condenações podem ter como origem três problemas: sanitários, de manejo e de operação industrial (Maschio & Raszl 2012).

Na perspectiva de garantir a segurança dos alimentos, pesquisas de Coliformes Totais e *Escherichia coli* podem ser utilizadas como parâmetros para monitoramento da qualidade sanitária dos frangos (Rodrigues et al. 2008).

Entre os patógenos bacterianos causadores de infecção em aves, *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) constitui-se um dos principais agentes responsáveis por perdas econômicas na indústria avícola. (Ferreira & Knöbl 2009), representando um dos maiores desafios da avicultura industrial moderna (Barnes, Nolan & Vaillancourt 2008; Ferreira & Knöbl 2009).

Os mecanismos de virulência da APEC têm sido continuamente estudados e acredita-se ser multifatorial. Apesar da existência de fatores reconhecidos por sua contribuição para a virulência de APEC, ainda não há um marcador definido ou conjunto de marcadores que definam o seu patotipo (Dziva & Stevens 2008).

Em 2008, Johnson et al. demonstraram que os genes plasmidiais *iutA* (que codifica receptores sideróforos) e *iss* (que codifica proteína de resistência ao sistema complemento)

eram significativamente mais frequentes em cepas APEC, sugerindo que estes poderiam servir como indicadores da patogenicidade desse patótipo.

Salienta-se ainda que as principais fontes de contaminação do frango são oriundas dos insumos e ambiente produtivo, sendo o frango veículo da disseminação do patógeno ao longo da cadeia produtiva, constituindo-se um problema de Vigilância Sanitária (Silva 2011).

Dentre as fontes de contaminação do ambiente produtivo destaca-se a cama que protege os animais do contato direto com o solo, absorve a água, incorpora fezes e penas e contribui com redução das oscilações da temperatura no galpão (Garcia, Lima & Caldara 2011). Segundo Paganini (2004), cama é todo o material distribuído sobre o piso de galpões para servir de leito às aves e é constituído de uma mistura de excreta, penas das aves, ração e o material utilizado sobre o piso, que geralmente é constituído de maravalha de madeira. Representa um nicho microbiológico que alberga vários patógenos implicados em problemas inerentes à segurança dos alimentos, destacando *E. coli*, relevante por causar infecções oportunistas ou condenação de carcaças (Fiorentin, 2005).

Diante da importância da cadeia produtiva de carne de frango para a segurança desse importante alimento e da carência de estudos que identifiquem possíveis fontes de contaminação microbiológica nos aviários, objetivou-se identificar a presença de Coliformes Totais e *Escherichia coli* patogênica nas amostras do ambiente e insumos dos aviários, bem como o potencial patógeno a partir da identificação de fatores de virulência de resistência sérica e receptores sideróforos.

2. Metodologia

2.1. Coleta das amostras

No período de julho a dezembro de 2014 foram identificados sete aviários fornecedores de frango (*Gallus gallus*) para um matadouro avícola do Recôncavo Sul da Bahia, os quais foram visitados duas vezes para coleta das amostras com intervalo entre 45 e 60 dias.

Em cada visita procedeu-se a coleta de amostras do ambiente (cama) e insumos (ração dos comedouros, ração dos galpões, água dos bebedouros e água da tubulação da distribuição), totalizando 10 amostras por aviário, obtendo um quantitativo final de 70 amostras.

As amostras foram coletadas assepticamente, identificadas, acondicionadas em caixa térmica contendo gelo reciclável e transportadas até o Laboratório de Pesquisa em Microbiologia do Núcleo de Segurança Alimentar e Nutricional (SANUTRI) do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Recôncavo da Bahia (CCS/UFRB), sendo as análises microbiológicas executadas em até duas horas.

2.2. Quantificação de Coliformes Totais e *Escherichia coli*

A determinação da população de Coliformes Totais e *Escherichia coli* das amostras de ração e cama foram realizadas por meio de método rápido de contagem em placas Petrifilm™ (3M Company), utilizando a placa Petrifilm EC, conforme recomendações do fabricante (AOAC 998.8). A contagem de colônias características foi realizada com auxílio de um contador de colônias modelo CP600 Plus (Phoenix®), calculando-se o número de log UFC/g (Silva et al., 2007).

Para as análises das amostras de água, a presença ou ausência de *Escherichia coli* em 100 mL foi realizada por meio do método rápido cromogênico ReadyCult® (Merck), conforme orientações do fabricante. Uma alíquota das amostras que apresentaram fluorescência azul sob luz ultravioleta, características de serem positivas para *Escherichia coli*, foram transferidas para placas de Petri contendo ágar Eosina Azul de Metileno (*Eosine-Methylene Blue*, EMB) com auxílio de alça de platina (diâmetro 0,46 por 5 cm), sendo selecionadas as colônias que apresentaram coloração verde metálico (Silva et al. 2007).

2.3. Pesquisa de genes de virulência de patótipos de *Escherichia coli*

Inicialmente foram isoladas até três colônias típicas de *Escherichia coli* oriundas da placa Petrifilm EC™ (3M Company) e EMB. Cada colônia foi inoculada, com o auxílio da alça de platina, em microtubo contendo o caldo Brain Heart Infusion (BHI), sendo incubado a $35\pm 1^\circ\text{C}$ por $24\pm 2\text{h}$. Após esse período, foi adicionado 2 mL de glicerol a 15 % e as amostras foram congeladas a 20°C negativos para posterior extração do DNA.

No processo de extração de DNA, as amostras foram reativadas em caldo BHI e incubadas a $35\pm 1^\circ\text{C}$ por $24\pm 2\text{h}$. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 13500 rpm. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado e acrescentado 800 μL de água deionizada, sendo realizada a homogeneização e centrifugação nas mesmas condições descritas anteriormente. Ao término, novamente descartou-se o sobrenadante e adicionou 80 μL de água deionizada e foi realizada a homogeneização. Após essa etapa, as amostras foram submetidas a 96°C por 10 minutos em banho-maria. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 20 segundos a 13500 rpm, sendo retirado 2 μL do sobrenadante e colocado em um microtubo contendo 18 μL de água deionizada. As amostras de DNA foram estocadas a 20°C negativos até o momento da análise.

Após a extração de DNA, foi realizada a quantificação do DNA, a qual foi estimada por meio de espectrofotômetro BioPhotometer D30 (Eppendorf™) e as amostras foram diluídas em água ultrapura (Hexapur™) para padronização da concentração final de 50 ng/10 μL .

Partindo das cepas de *Escherichia coli* isoladas dos insumos e ambiente produtivo, pesquisou-se os genes de virulência associados aos patótipos APEC (*iss* e *iutA*) por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR).

Os componentes utilizados para a realização da PCR estão descritos no Quadro 1.

As reações foram preparadas em câmara asséptica e 24 μL do mix (Quadro 2) foram distribuídas em tubos de polipropileno de 0,5 mL, sendo adicionado 1 μL de cada amostra em cada tubo. Para o controle negativo utilizou-se a água ultrapura (Hexapur™), para os controles positivos foram utilizadas cepas padrões cedidas pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro, APEC (ATCC 25922). As reações de amplificação foram realizadas em termociclador do tipo Mastercycler (Amplitherm™).

Posteriormente, 10 μL do produto amplificado, assim como os controles positivo e negativo, e 2 μL do peso molecular de 50pb DNA *ladder* foram adicionados em cada poço do gel de agarose a 2%, corado com brometo de etídio (10 mg/mL), realizando-se a separação mediante eletroforese, utilizando o equipamento GSR® 1000STD em condições de 100 minutos, 60V, 37mA e 2W. Após essa etapa os resultados foram observados ao transiluminador ultravioleta (Loccus®).

2.4. Análise Estatística

A análise estatística foi realizada por meio do *software* SPSS versão 20.0. Realizou-se análise descritiva, sendo média e desvio padrão para as variáveis quantitativas, e porcentagem para as variáveis categóricas. Foram calculadas as médias e desvio padrão das contagens de microrganismos encontradas.

A média das bactérias foram submetidas a análise de variância (ANOVA) e comparados pelo teste de Tuckey em relação à variação entre os pontos de cultivo. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significantes.

3. Resultados

A partir das análises realizadas, foi evidenciada a presença dos Coliformes Totais (CT) em 82,85% das amostras, com população entre 1,48 a 8,40 log UFC/g, enquanto a presença de

Escherichia coli foi detectada em 71,42% das amostras analisadas, cuja população esteve entre <0,95 a 7,79 log UFC/g (Quadro 3).

Em análise comparativa das amostras do ambiente e insumos, a cama configurou-se como a amostra de com maior população de *E. coli*, apresentando média da população de 5,36 log UFC/g, seguido das amostras de ração do comedouro (3,00 log UFC/g), ração do depósito (2,60 log UFC/g). *E. coli* esteve presente em 78,57% (n=12) das amostras da água do bebedouro, enquanto as amostras coletadas da água do sistema de distribuição apresentaram a menor contaminação, 35,71% (n=5).

Ao avaliar a contaminação microbiológica por aviários, conclui-se que o aviário G apresentou maior população microbiana, apresentando média de 5,60 log UFC/g, 4,52 log UFC/g, para Coliformes Totais e *Escherichia coli*, respectivamente, seguido do aviário F, E, D, C e A. O aviário B apresentou menores índices de contaminação, apresentando média de 3,45 UFC/g Coliformes Totais e 1,50 log UFC/g para *Escherichia coli* e (Quadro 4).

No que tange a genotipagem, os resultados do estudo revelaram que foram amplificados simultaneamente os genes de virulência *iss* e *iutA* em 34,0% (n=17), a partir dos isolados de *Escherichia coli* das amostras de ambiente e insumos de aviários. Conforme descrito no quadro 5, Os genes *iutA* e *iss* foram detectados em 92,0% e 34,0% dos isolados de *E. coli*, respectivamente, sendo observado que os genes *iutA* foram mais prevalentes quando comparados aos genes *iss* para todos os isolados oriundos da cama, água do bebedouro e água de distribuição. A amplificação exclusiva do gene *iutA* ocorreu em 58% (29/50), enquanto o gene *iss* não foi detectado unicamente em nenhuma das cepas avaliadas, estando sempre associado à presença do gene *iutA*.

4. Discussão

O sucesso ou a falha da produção de frangos está diretamente ligado às condições ambientais nos quais os animais são criados (Bueno & Rossi, 2006). De acordo com Mohamed, Shehata & Rafeek (2014) a presença de *E.coli* nos sistemas de criação de aves é prevalente, conferindo ao ambiente produtivo papel fundamental para a qualidade do frango, caracterizando os procedimentos de higienização como preditores para a permanência ou eliminação do patógeno no ambiente, como bebedouro, comedouro, cama de frango, paredes e pisos, como afirmado por Nogrady et al. (2008) e Heyndrickx et al. (2002), podendo permitir assim a contaminação de lotes posteriores de frangos originalmente livres de patógenos.

A população elevada de microrganismos indicadores, como Coliformes Totais, pode inferir a ocorrência de falhas higiênico-sanitárias no manejo de criação das aves.

A partir dos achados dessa pesquisa, pode-se atribuir ao frango, o papel de veículo carreador de microrganismos ao longo da cadeia produtiva. A presença de patógenos na cama configura a mesma como reservatório de microrganismos que podem contaminar a ave, e os insumos aviários, como a ração do comedouro, depósito e a água do bebedouro, e ainda, recontaminar o ambiente, em decorrência do contato direto do frango com esses substratos durante o período de criação, mantendo ativo esse ciclo contaminante.

A diferença de contaminação entre as rações, depósito e comedouro pode estar atribuída ao contato do frango com esses substratos, pois a ração do depósito tem contato reduzido com a ave, assim como a baixa população microbiana nas amostras de água do sistema de distribuição, que também podendo ser justificada em decorrência da inexistência do contato das aves com o sistema de distribuição de água. Desta forma, potencializa os riscos ao consumidor, visto que o contato direto do frango a esses substratos pode influenciar na presença do patógeno na ave. Neste contexto, a cama representa um ambiente propício para a manutenção e permanência de microrganismos.

Entretanto, o ambiente do aviário pode sofrer influência de camas de frango com alto teor de umidade, que interage com altas temperaturas do ambiente, levando a elevação dos incrementos na emissão de amônia, o que provoca uma queda na produtividade dos animais

(Menegali 2009). O que de acordo com Oliveira et al. (2003) tornam as aves mais predispostas a doenças respiratórias, aumentam os riscos de infecções, prejudicando processos fisiológicos de trocas gasosas. Causando ainda, estresse aos frangos, o que leva à perda de peso e pode provocar a morte das aves (Hernandes & Cazetta 2001).

A contagem de enterobactérias está intimamente relacionada ao tempo de uso da cama, em decorrência da incorporação gradativa de grande quantidade de dejetos à cama, aumentando a sua população microbiana (Roll et al. 2008). Salientando que a reutilização da cama deve ser realizada quando proveniente de lotes saudáveis e tratada antes do uso, evitando dessa forma que a cama atue como veículo de bactérias patogênicas (Diniz, Mello & Salcedo 2015).

Justificando a importância da qualidade do ambiente aviário, Otutumi et al. (2013) avaliaram a influência da cama em dermatoses, e concluíram que tratamento com microrganismo benéfico na cama aviária apresentaram melhora no aproveitamento de frangos e redução para as dermatoses, o que implica em menores perdas econômicas para as agroindústrias. Sendo assim, a cama aviária é um importante aspecto a ser considerado na produção avícola. Bassan et al. (2008) e Alzawqari et al. (2013) ressaltam que pode ocorrer ingestão de cama aviária com risco de contaminação por enteropatógenos na etapa final do manejo pré-abate, quando as aves são submetidas à restrição alimentar, potencializando a necessidade de manter a qualidade da mesma, visando a segurança microbiológica das aves.

Desta forma, as etapas do processo produtivo de frango incitam a necessidade do desenvolvimento de alternativas com vistas à qualidade e segurança dos alimentos a fim de minimizar contaminações e prejuízos na indústria avícola (Saki et al. 2012).

Somando-se as características do ambiente, os insumos (água e ração), possuem a mesma relevância, por interferir diretamente índices zootécnicos e na disseminação de enfermidades, acarretando graves prejuízos econômicos, além de carrear agentes patogênicos de doenças de interesse em saúde pública (Soares & Mesa, 2009).

Assim, medidas de controle microbiológico da água devem ser consideradas como prioridade a fim de evitar tais doenças, evitando perdas econômicas e riscos associados ao consumo animal (Gama et al. 2008). O consumo de água de qualidade favorece melhor condição morfofisiológica, manutenção da integridade intestinal e consequente melhora significativa nos parâmetros de desempenho das aves (Gama et al. 2009; Amoroso 2009).

Contudo, a água utilizada para dessedentação (bebedouros) das aves, pode ser contaminada no interior do aviário por meio do contato com fezes, secreções e muco de aves doentes (Amaral, 2004).

Escherichia coli é considerado indicador da qualidade microbiológica da água dos aviários, representando 95% das bactérias que compõem o grupo dos Coliformes Termotolerantes. Sua presença é o melhor indicador para contaminação fecal (Jay, 2005).

No presente trabalho pode-se atribuir também a contaminação da água dos bebedouros, bem como a ração do comedouro e depósito, associados ao contato direto da cama, pois foi observada a presença de cama nesses insumos, considerando a ave como contaminante da cama e responsável por carrear cama para bebedouro, comedouro e depósito de ração, ou seja, carreador de patógeno.

No estudo de Togashi et al. (2008) avaliou-se a qualidade microbiológica da água para dessedentação de poedeiras fornecida por diferentes tipo de bebedouros taça e nipple (chupeta), sendo o primeiro caracterizado por armazenar a água a disposição das aves, facilitando assim a exposição às condições ambientais, e o segundo por representar um sistema fechado e capaz de libera água através do toque do bico das aves (Carr et al. 1988). Os pesquisadores observaram que as amostras de água fornecidas por bebedouro *nipple* não apresentaram concentração de Coliformes Totais ou termotolerantes, ou seja, o contato menor da ave com a água reduz a contaminação microbiana.

Desta forma, pode-se sugerir que quanto maior o contato das aves com a água/bebedouro maior a probabilidade de contaminação, sugerindo maior possibilidade de contaminação cruzada entre os animais do aviário, além de necessitarem maior frequência de higienização de

equipamentos e instalações, visando à redução da contaminação e atribuindo ao frango um veículo carreador microbiológico ao longo das etapas produtivas. O que é confirmado com os achados de Duarte et al. (2014) que avaliaram a qualidade da água de consumo para bovinos e concluíram que as áreas onde havia livre acesso foi detectada *E. coli* nos recursos hídricos por pisoteio do solo, fezes e urina, enquanto que as áreas sem o acesso dos animais e tratada com cloro não apresentaram Coliformes Totais, demonstrando a eficiência deste tratamento e correlação positiva entre o contato animal e contaminação.

Não obstante, a elevada contaminação microbiana apresentada pelos aviários pode ser em decorrência da reutilização da cama, pois, conforme o relato dos avicultores, as mesmas não passam por processo de tratamento e/ou descontaminação para receber novos lotes de frango, podendo ser reutilizada até seis vezes, possibilitando a veiculação de microrganismos patogênicos ao longo da cadeia produtiva. Observou-se ainda, que a discrepância entre o aviário B e os demais com relação à presença de *E. coli*, podendo está atribuído a cama, por ser um material novo, e pouco tempo em contato com as aves no momento que foi coletado, bem como a elevada contaminação no aviário G foi decorrente a reutilização da cama, que visivelmente foi reaproveitada de outros lotes devido ao acúmulo de dejetos na mesma..

Verificou-se a partir da análise de comparação de médias, através do teste Tukey, que houve diferença estatística da contaminação microbiana apenas para cama evidenciando a sua relevância no processo contaminante do ambiente avícola, inclusive na carreação de patógeno para os insumos.

Diante da elevada presença de *E. coli* em ambiente e insumos de aviários fez-se necessário identificar o potencial patogênico das cepas, dessa forma, a genotipagem configura-se como um método eficiente para identificação de cepas bacterianas patogênicas, como APEC.

Nakazato et al. (2009) relataram que a caracterização molecular e biológica é necessária para o entendimento da patogênese da APEC, visando o desenvolvimento de ferramentas que podem prevenir as perdas econômicas causadas por estas linhagens.

Corroborando com os achados genéticos do estudo, Corrêa et al. (2013) amplificaram o gene *iss* em 92,8% dos isolados (26/28) e o gene *iutA* em 71,4% (20/28) de amostras coletadas em aves no Brasil. Da mesma forma, Rodriguez-Siek et al. (2005), em estudo sobre a prevalência de genes de virulência nas APEC nos Estados Unidos, encontraram o gene *iss* em amostras de aves (frangos e perus) em 76,5% dos isolados e o gene *iutA* em 92,7% destas amostras.

Para classificação da patogenicidade de *Escherichia coli*, Yurong et al. (2015) atribuíram a presença dos genes de virulência da APEC *iss*, *iutA*, *iroN*, *ompT* e *hlyF*, e em seu estudo observaram que entre 87 isolados de *E. coli*, 41 (47,1%) apresentaram três ou mais genes de virulência.

Gines et al. (2015) concluíram que dentre 22 isolados da APEC, 91% (20) continham os genes de virulência preditores de APEC, *iutA* e *iss*, salientando que os frangos são os reservatórios desse patotipo e que os genes associados à virulência poderiam ser transmitidos para a comunidade por meio da cadeia alimentar.

Oliveira et al. (2015) avaliaram 72 cepas isoladas de *Escherichia coli* oriundas de galinhas caipiras, todas as cepas apresentaram o gene *iss*, enquanto que a frequência para *iutA* foi de 88,9% (n=64).

Wang et al. (2015) atribuíram a presença de genes *iutA* e *iss* com maior frequência em estirpes de *Escherichia coli* altamente patogênicas, conferindo evidências que demonstram que a patogenicidade de cepas de *E. coli* está associado com o número e combinação de genes associados à virulência.

O patotipo APEC causa infecções extraintestinais em aves, como infecção respiratória, pericardite e septicemia. Em humanos estão associados a infecções intra-abdominais (Kaper, 2005). Diante do exposto, Montassier et al. (2015) indicam que os frangos de corte que portam um conjunto relevante de genes virulentos, pode aumentar significativamente a ocorrência e gravidade de colibacilose nas aves.

Entretanto, visando à redução da carga microbiológica, medidas de controle são requeridas na indústria aviária para culminar na garantia de produtos seguros para o consumo

humano, redução de perdas com condenação de carcaças e manutenção da produção em larga escala da avicultura nacional.

5. Conclusão

Diante da crescente demanda da indústria aviária, a qualidade dos frangos é objeto de interesse, visando redução de condenação dos produtos, bem como a garantia da segurança alimentar para o consumidor.

Neste contexto promissor é indispensável o planejamento e execução de estratégias que contemplem a sanidade das aves nos aviários, pois a presença de patógenos no ambiente produtivo, assim como nos insumos, configura-se como risco potencial para a contaminação do frango, considerando o potencial zoonótico das APEC.

Assim, a comprovação da presença dos genes de virulência *iss* e *iutA* nos isolados de *Escherichia coli*, oriundos do ambiente e insumos dos aviários deve ser um alerta para produtores e consumidores.

Não obstante, os resultados obtidos na pesquisa salientam a importância de técnicas efetivas no manejo sanitário para criação de frangos, em especial ao que tange a cama, em que medidas de controle precisam ser implementadas para cada troca de lote, visando à redução da população microbiana, principalmente de *Escherichia coli*.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão de bolsa de estudos. À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro pela disponibilização das cepas padrão utilizado como controle positivo e aos aviários que permitiram a coleta das amostras.

6. Referências

ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual de Atividades 2015. Disponível em: < http://abpa-br.com.br/files/RelatorioAnual_UBABEF_2015_DIGITAL.pdf>. Acesso em: 13 jan 2016.

Alzawqari M.H., Kermanshahi H., Nassiri Moghaddam H., Tawassoli M.H. & Gilani, A. 2013. Impact of feed withdrawal and addition of acetic acid in drinking water during preslaughter phase on intestinal microbiota of broilers. African Journal of Biotechnology, Benin City, 12(10):1164-1167.

Amaral L.A. 2004. Drinking Water as a Risk Factor to Poultry Health. Braz J Poult Sci, 6(4):191-199.

Amoroso L. Respostas densitométricas, morfofisiológicas e desempenho de frangos de corte tratados com água filtrada e não filtrada. Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias, Jaboticabal, 2009.

Barnes H.J., Nolan L.K. & Vaillancourt J.P. Colibacillosis. In: SAIF, Y. (Ed.). Diseases of poultry. 12th. ed. Ames, Iowa: Blackwell Publishing, 2008. p. 691–737.

Barros L.S.S., Silva, R.M., Silva, I.M.M., Baliza, M. & Freitas, F. 2012. A Avicultura brasileira e sua afinidade com a celulite aviária. Arquivos de Pesquisa Animal. Cruz das Almas, 1(2):78-97.

- Bassan J.D., Flores M.L., Antoniazzi T., Bianchi E., Kuttel J. & Trindade M.M. 2008. Controle da Infecção por *Salmonella enteritidis* em frangos de cortes com ácidos orgânicos e mananoligossacarídeos. *Ciência Rural*, Santa Maria, 38(7):1961-1965.
- Bueno L.G.F. & Rossi L.A. 2006. Comparação entre tecnologias de climatização para criação de frangos quanto a energia, ambiência e produtividade. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, Campina Grande, 10(2):497-504.
- Carr, L.E, Murphy, D.W, Wabeck, C.J. 1988. In: *Livestock Environment III: Proceedings of the Third International Livestock Environment Symposium*, 3:279-285.
- Corrêa I.M.O., Flores F., Schneiders G.H., Pereira L.Q., Brito, B.G. & Lovato, M. 2013. Detecção de fatores de virulência de *Escherichia coli* e análise de *Salmonella* spp. em psitacídeos. *Pesquisa Veterinária Brasileira*, 33(2):241-246.
- Diniz T.T., Mello J.L.M. & Salcedo Y.T.G. 2015. Temperatura do ambiente e reutilização da cama no desempenho e qualidade da carne de frango. *Ciência & Tecnologia: FATEC-JB, Jaboticabal (SP)*, 7(1):47-62.
- Duarte K.M.R., Gomes L.H., Dozzo A.D.P., Rocha F., Lira S.P. & Demarchi J.J. 2014. Qualidade Microbiológica da Água para Consumo Animal. *Indústr. Anim., Nova Odessa*, 71(2):135-142.
- Dziva, F. & Stevens M.P. 2008. Colibacillosis in poultry: unravelling the molecular basis of virulence of avian pathogenic *Escherichia coli* in their natural hosts. *Avian Pathology* 37(4):355-366.
- Ferreira A.J.P. & Knöbl T. Colibacilose. In: BERCHIERI JUNIOR, A.; SILVA, E.N.; DI FÁBIO, J.; SESTI, L.; ZUANAZE, M.A.F. (Ed.). *Doenças das aves*. 2. ed. Campinas: APINCO, 2009. p. 457-471.
- Fiorentin, L. Reutilização da cama na criação de frangos de corte e as implicações de ordem bacteriológica na saúde humana e animal. 23p. Embrapa Suínos e Aves. Documentos, 94). Concórdia: 2005.
- Gama N.M.S.Q., Ângela H.L., Freitas E.R., Guastalli E.L., Togashi C.K. & Buim R. 2009. Desempenho de poedeiras comerciais consumindo água filtrada. *Arq. Inst. Biol., São Paulo*, 76(3):347-352.
- Gama N.M.S.Q., Togashi C.K., Ferreira N.T., Buim M.R., Guastalli E.L. & Fiagá D.A. M. *Conhecendo a água utilizada para as aves de produção*. Divulgação técnica: Instituto Biológico, Centro Avançado de Pesquisa Tecnológica do Agronegócio Avícola, Unidade de Pesquisa e Desenvolvimento de Bastos, Avs, SP, Brasil, 2008.
- Garcia R.G., Lima I.C. & Caldara, R.F. 2011. Papel da cama na produção e no bem estar de frangos de corte. *Revista do Avisite, Campinas*, 5(47):46-50.
- Gines M.S., Cameron K.V., Badiola I., Dolz R., Majó N., Dahbi G., Viso S., Mora A., Blanco J., Carrasco N.P., López J.J.G. & Garcia L.M. 2015. Diversity of Multi-Drug Resistant Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Causing Outbreaks of Colibacillosis in Broilers during 2012 in Spain. *PLoS ONE* 10(11):e0143191. doi:10.1371/journal.pone.0143191.

Hernandes R., Cazetta J.O. & Moraes V.M.B. 2002. Frações nitrogenadas, glicídicas e amônia liberada pela cama de frangos de corte em diferentes densidades e tempos de confinamento. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 31:1795-1802.

Heyndrickx M., Vandekerchove D., Herman L., Rollier I., Grijspeerdt K. & Zutter L. 2002. Routes for *Salmonella* contamination of poultry meat: epidemiological study from hatchery to slaughterhouse. *Epidemiology and Infection* 129(2):253-265.

Jay J.M. *Microbiologia de alimentos*. 6 ed. São Paulo: Artmed, 2005. 711p.

Johnson T.J., Wannemuehler Y., Doetkott C., Johnson S. J., Rosenberger S.C. & Nolan L K. 2008. Identification of minimal predictors of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence for use as a rapid diagnostic tool. *Journal of Clinical Microbiology* 46(12):3987-3996,

Kaper J.B. Pathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Med. Microbiol.*, 295:355-356, 2005.

Knöbl T., Moreno A.M., Paixão R., Gomes T.A.T., Aparecida M., Vieira M., Leite D.S., Blanco J.E. & Ferreira A.J.P. Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Clone Harboring *sfa* Gene in Brazil. *The Scientific World Journal*. 7 p., 2012. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3361264/pdf/TSWJ2012-437342.pdf>> . Acesso em: 13 mai. 2015.

Marques H.L., Stuchi R. & Antunes R. 2010. O controle da salmonela. *Avicultura Industrial*, São Paulo, 101(05):47-49.

Maschio M.M. & Raszl S.M. 2012. Impacto financeiro das condenações post-mortem parciais e totais em uma empresa de abate de frango. *Revista E-Tech: Tecnologias para Competitividade Industrial*, Florianópolis, 1(1):26-38.

Menegali, I. Avaliação de diferentes sistemas de ventilação mínima sobre a qualidade do ar e o desempenho de frangos de corte. (Doutorado – Engenharia Agrícola) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa. 2009.

Mohamed M.A., Shehata M.A. & Rafeek E. Virulence Genes Content and Antimicrobial Resistance in *Escherichia coli* from Broiler Chickens. *Veterinary Medicine International*, 2014;2014:195189. doi: 10.1155/2014/195189..

Montassier M.F.S., Borges C.A., Oliveira E.S., Borzi M.M., Cardozo M.V., Maluta R. P., Montassieri H.J. & Ávila F.A. 2015. Caracterização Molecular De Isolados De *Escherichia coli* Patogênica Aviária (Apec) De Frangos De Corte Abatidos Em São Paulo. *ARS VETERINARIA*, Jaboticabal, SP, 31(2):29.

Nakazato G., Campos T.A., Stehling E.G., Brocchi M. & Silveira W.D. 2009. Virulence factors of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Pesq. Vet. Bras.*, Rio de Janeiro, 29(7): 479-486.

Nogrady N., Kardos G., Bistyak A., Turcsanyi I., Meszaros J., Galantai Z., Juhasz A., Samu P., Kaszanyitzky J.E., Paszti J. & Kiss I. 2008. Prevalence and characterization of *Salmonella* *Infantis* isolates originating from different points of the broiler chicken-human food chain in Hungary. *International Journal of Food Microbiology*. 127(1-2):162-167.

Oliveira M.C., Almeida C.V., Andrade D.O. & Rodrigues S.M.M. 2003. Teor de matéria seca, pH e amônia volatilizada da cama de frango tratada ou não com diferentes aditivos. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 32:951-954.

Oliveira E.S., Cardozo M.V., Montassier M.F.S., Borzi M.M. & Avila F.A. 2015. Classificação Filogenética e Caracterização Genotípica dos Isolados de *Escherichia coli* Patogênica Aviária (APEC) Provenientes de Galinhas Caipiras. ARS VETERINARIA, Jaboticabal, SP, 31(2):32.

Otutumi L.K. Amaral P.F.G.P., Piau Júnior R., Moura D.J., Carvalho T.M.R., Dalberto J. L. & Brito B.G. 2013. Efeito de micro-organismos benéficos no tratamento da cama de frango. Arq. Ciênc. Vet. Zool. UNIPAR, Umuarama, 16(2):121-127.

Paganini F.J. Produção de frangos de corte: Manejo de cama. Ed. MENDES, A. A.; NÄÄS, I. de A.; MACARI, M. Campinas: FACTA. 356p. 2004.

Prata, L. F. 2008. Zoonoses na segurança alimentar. Avicultura industrial – inocuidade da carne e ovos. Biológico, São Paulo, 70(2):51-56.

Rodrigues A.C.A., Pinto P.S.A, Vanetti M.C.D., Pinto P.D.B.M.S. & Nero L.A. 2008. Análise e monitoramento de pontos críticos no abate de frangos utilizando indicadores microbiológicos. Ciência Rural, Santa Maria, 38(7):1948-1953.

Rodriguez-Siek, K.E., Giddings C.W., Doetkott C., Johnson T.J. & Nolan L.K. 2005. Characterizing the APEC pathotype. Veterinary Research, 36:241-256.

Roll V.F.B., Lopes L.L., Gonçalves F.M., Ancuti M., Leite F.L., Corrêa E.K., & Xavier E.G. 2008. Condição microbiológica de cama tratada com Impact P® em matrizes de frangos de corte. Ciência Rural, 38(9):2650-2653.

Saki A.A. Harcini R.N., Rahmatnejad E. & Salary J. 2012. Herbal additives and organic acids as antibiotic alternatives in broiler chickens diet for organic production. African Journal of Biotechnology. 11(8): 2139-2145.

Silva I.J.O. & Vieira F.M.C. 2010. Ambiência animal e as perdas produtivas no manejo pré-abate: o caso da avicultura de corte brasileira. Archivos de Zootecnia. 59:113-131.

Silva N., Junqueira V.C.A., Silveira N.F.A., Taniwaki M.H., Santos R.F.S. & Gomes, R.A.R Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos. 3. Ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007.

Silva R.M. Caracterização fenotípica e genotípica de *Escherichia coli* proveniente de lesões de celulite de frangos de corte. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal), Centro de Ciências Agrárias Ambientais e Biológicas, Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Cruz das Almas, 2011.

Soares N.M. & Mesa D.A. Manejo da água na produção de ovos. 2009. Artigo em Hypertexto. Disponível em: <http://www.infobibos.com/Artigos/2009_3/ovos/index.htm>. Acesso em: 13/9/2015

Togashi C. K., Angela H.L., Freitas E.R., Guastalli E.A.L., Buim M.R. & Gama N.M.S.G. 2008. Efeitos do tipo de bebedouro sobre a qualidade da água e o desempenho e a qualidade dos ovos de poedeiras comerciais. R. Bras. Zootec. 37(8):1450-1455.

Vaz C.S.L., Rech D.V., Alves L. & Klein C. S. 2010. *Campylobacter*: panorama atual na avicultura de corte. **Avicultura Industrial**, São Paulo, 102(10):14-24.

Wang J., Tang P., Tan D., Wang L., Zhang S., Qiu Y., Dong R., Liu W., Huang J., Chen T., Ren J., Li C. & Liu H. 2015. The Pathogenicity of Chicken Pathogenic *Escherichia coli* Is Associated with

the Numbers and Combination Patterns of Virulence-Associated Genes. Open Journal of Veterinary Medicine, 5: 243-254. doi:10.4236/ojvm.2015.512033.

Yurong L., Ligong C., Xianjun W. & Shuying H. 2015. Molecular characterization of multidrug-resistant avian pathogenic *Escherichia coli* isolated from septicemic broilers. Poultry Science. 94(4):601-611.

Quadro 1 - Características dos *primers* utilizados para a PCR em insumos e ambiente de aviários de um matadouro avícola do Recôncavo da Bahia.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos	Amplicom (PM)	Função
iss*	GTGGCGAAAACACTAGTAAACAGC CGCCTCGGGGTGGATAA	760	Resistência ao soro
iutA**	GGCTGGACATCATGGGAACTGG CGTCGGGAACGGGTAGAATCG	302	Aquisição de ferro

* Fonte- Knöbl et al. (2012) ** Fonte Johnson et al. (2008). PM-Peso Molecular

Quadro 2 - Componentes utilizados na realização da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) para amplificação dos genes *iss* e *iutA* em amostras de insumos e ambiente oriundos de aviários.

Componentes	Volume (µL)	Concentração
Água deionizada	15,2	-
PCR buffer	5	0,2 µMol
dNTP mix	0,5	0,02 µMol
MgCl ₂	1,5	1,5 µMol
Taq DNA polimerase	0,27	-
Iniciador I	1,6	-
Iniciador II	1,6	-
DNA-molde	1	50 ng/10µL
Total	25	-

Quadro 3 - Frequência de Coliformes Totais (CT) e *Escherichia coli* (*E. coli*) em amostras de ambiente e insumos de aviários do Recôncavo da Bahia, 2014

Amostra	População de CT*	CT	População de <i>E. coli</i> *	<i>E. coli</i>
Ração Depósito	3,78 ^a 1,48 ^b -5,70 ^c (±1,50) ^d	14/14-100%	2,60 ^a <0,95 ^b -5,08 ^c (±1,43) ^d	10/14-71,42%
Ração Comedouro	4,30 ^a 1,90 ^b -5,73 ^c (±1,36) ^d	14/14-100%	3,01 ^a <0,95 ^b -5,28 ^c (±1,55) ^d	11/14-78,57%
Cama	6,13 ^a 2,48 ^b -8,40 ^c (±1,73) ^d	14/14-100%	5,36 ^a <0,95 ^b -7,79 ^c (±1,57) ^d	13/14-92,85%
Água sistema	NQ	05/14-35,71%	NQ	5/14-35,71%
Água Bebedouro	NQ	11/14-85,71%	NQ	11/14-78,57%
Total	4,49 ^a 1,48 ^b -8,40 ^c (±1,43) ^d	82,85%	3,46 ^a <0,95 ^b -7,79 ^c (±1,50) ^d	71,42%

^aMédia ^bMínimo ^cMáximo ^dDesvio Padrão NQ Não quantificado

*Valores expressos em log.

Quadro 4 - Frequência de Coliformes Totais e *Escherichia coli* em aviários do Recôncavo da Bahia, 2014.

Aviários	População de Coliformes Totais*	População de <i>E. coli</i> *
A	4,29 ^a 1,81 ^b -8,40 ^c (±1,81) ^d	3,20 ^a <0,95 ^b -5,60 ^c (±1,55) ^d
B	3,72 ^a 1,90 ^b -5,20 ^c (±1,15) ^d	2,54 ^a <0,95 ^b -4,90 ^c (±1,48) ^d
C	4,21 ^a 1,48 ^b -7,99 ^c (±1,76) ^d	3,38 ^a 1,00 ^b -7,79 ^c (±1,48) ^d
D	4,54 ^a 2,48 ^b -5,62 ^c (±0,97) ^d	3,38 ^a <0,95 ^b -5,48 ^c (±1,14) ^d
E	4,73 ^a 3,15 ^b -7,00 ^c (±1,18) ^d	3,77 ^a 2,08 ^b -6,15 ^c (±1,19) ^d
F	4,93 ^a 3,08 ^b -7,54 ^c (±1,50) ^d	3,99 ^a <0,95 ^b -7,00 ^c (±1,72) ^d
G	5,00 ^a 3,30 ^b -7,71 ^c (±1,14) ^d	3,97 ^a 2,30 ^b -6,32 ^c (±1,32) ^d

^aMédia ^bMínimo ^cMáximo ^dDesvio Padrão

*Valores expressos em log.

Quadro 5 - Frequência de *Escherichia coli* e genes de virulência em amostras de ambiente e insumos de aviários do Recôncavo da Bahia, 2014.

Origem	<i>E. coli</i>	<i>iutA</i>	<i>iss</i>
Cama	13/14	12/13	04/13
Água Bebedouro	11/14	11/11	05/11
Água Distribuição	05/14	04/05	02/05
Ração Comedouro	11/14	11/11	06/11
Ração Depósito	10/14	08/10	0/10
Total	50/70	46/50 (92,0%)	17/50 (34,0%)

|

CAPÍTULO 3

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS NATURAIS FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA ISOLADAS DO PROCESSO PRODUTIVO DE CARNE DE FRANGO.

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE COMPOSTOS NATURAIS FRENTE A CEPAS DE *Escherichia coli* PATOGÊNICA ISOLADAS DO PROCESSO PRODUTIVO DE CARNE DE FRANGO.

FRONT OF NATURAL COMPOUNDS THE ANTIMICROBIAL ACTIVITY STRAINS PATHOGENIC *Escherichia coli* ISOLATED PRODUCTION PROCESS OF CHICKEN.

Lívia Souza Guimarães Rocha e Silva⁽¹⁾, Paulo José Lima Juiz⁽²⁾, Ricardo Mendes da Silva⁽¹⁾, Gabrielly Sobral Neiva⁽¹⁾ e Simone Teles Braga⁽¹⁾, Isabella de Matos Mendes da Silva⁽²⁾

1 - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas. Rua Rui Barbosa, 710 - Campus Universitário CEP 44380-000, Cruz das Almas/BA. lr.liviarocha@gmail.com, ricardomendes@ufrb.edu.br, neiva.gs@hotmail.com, telessimnone@gmail.com.

2 - Universidade Federal do Recôncavo da Bahia- Centro de Ciências da Saúde. Avenida Carlos Amaral, 1015 - Cajueiro, Santo Antônio de Jesus/BA, CEP 44.570-000. isabellamatos@ufrb.edu.br, paulojuiz@ufrb.edu.br

Resumo

Objetivou-se neste trabalho avaliar o potencial antibacteriano de óleo essencial extraído de folhas e inflorescência de *Lippia organoides* (Kunth) e o extrato de *Agave sisalana* (Perrine) frente a *Escherichia coli* patogênica, isoladas do ambiente e insumos de aviários, lesão de celulite e fígado de frango. Isoladas por meio de método rápido de contagem em placas Petrifilm™ e método rápido cromogênico Readycult® (Merck), as amostras de *E. coli* foram analisadas quanto a presença dos genes *iss* e *iutA*, utilizando a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Selecionou-se 5 cepas de *E. coli* positiva para os genes *iutA* e *iss*, oriundas do ambiente e insumos, lesão de celulite e fígado de frango, as quais foram submetidas a teste de sensibilidade antimicrobiana frente a óleo essencial extraído de folhas e inflorescência de *L. organoides* e extrato de *A. sisalana*, utilizando o teste de microdiluição em caldo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) apresentada pelo óleo essencial de *L. organoides* foi de 0,54 mg.mL⁻¹ para a *E. coli* patogênica isolada da lesão de celulite, fígado, água, ração e cama, considerada como bacteriostática. A CIM para a ATCC 25922 foi 1,09 mg.mL⁻¹, avaliada como bacteriostática. A Concentração Bactericida Mínima (CBM) para os isolados da ração foi de 1,09 mg.mL⁻¹, fígado, água e cama apresentaram CBM de 2,18 mg.mL⁻¹, enquanto que os isolados de lesão de celulite e cepa padrão (ATCC 25922) apresentaram CBM de 4,37 mg.mL⁻¹ e 8,75 mg.mL⁻¹, respectivamente. Em contraposto, o extrato de sisal não apresentou atividade antibacteriana em nenhuma das concentrações avaliadas frente a todas as cepas estudadas. Portanto, a utilização de folhas de *L. organoides* no ambiente produtivo de carne de frango com vistas na inibição do crescimento microbiano, propicia segurança ao consumidor, visto a presença de microrganismos patogênicos durante o processo produtivo de carne de frango, haja vista o potencial zoonótico da bactéria.

Palavras-chave: *Lippia origanoides*, alecrim-pimenta, *Agave sisalana*, sisal, fitoterapia, aviários.

Abstract

The aim of this study was to evaluate the essential oil antibacterial potential extracted from leaves and inflorescence of *Lippia origanoides* (Kunth) and extract *Agave sisalana* (Perrine) against pathogenic *Escherichia coli*, isolated from the environment and aviaries inputs, cellulitis and chicken liver injury. Isolated by fast method count on Petrifilm™ plates and quick method chromogenic Readycult® (Merck), samples of *E. coli* were analyzed for the presence of genes *iss* and *iutA*, using the Polymerase Chain Reaction (PCR). Is 5 selected positive *E. coli* strains for the genes *iss* and *iutA*, coming from the environment and inputs, cellulitis and chicken liver injury, which were submitted to antimicrobial susceptibility testing against essential oil extracted from leaves and inflorescence *L. origanoides* and extract *A. sisalana*, using the broth microdilution test. The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) presented by the essential oil of *L. origanoides* was 0.54 mg.mL^{-1} for pathogenic *E. coli* isolated from cellulitis injury, liver, water, feed and bed, considered bacteriostatic. The CIM to ATCC 25922 was 1.09 mg.mL^{-1} , assessed as bacteriostatic. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) for isolated ration was 1.09 mg.mL^{-1} , liver, water and bed showed CBM 2.18 mg.mL^{-1} , whereas cellulite injury isolated and standard strain (ATCC 25922) showed CBM 4.37 mg.mL^{-1} and 8.75 mg.mL^{-1} , respectively. In counterposed, extract sisal presented no antibacterial activity in any of the evaluated the concentrations of all studied strains. Therefore, the use of *L. origanoides* leaves in the production of chicken environment aiming at inhibiting microbial growth, provides consumer safety, since the presence of pathogenic microorganisms during the production process of chicken, given the zoonotic potential of the bacteria.

Keywords: *Lippia origanoides*, pepper-rosemary, *Agave sisalana*, sisal, herbal medicine, aviaries.

1. Introdução

Escherichia coli patogênica para aves (APEC) é uma bactéria responsável por colibacilose, uma das principais doenças da avicultura industrial moderna (Ferreira & Knöbl, 2009). A associação deste microrganismo a outros patógenos e a manifestação sob a forma de celulite aviária, a qual acomete frangos de corte, resulta em um grande número de condenações em matadouros (Ferreira et al., 2012), principalmente em decorrência das condenações parciais e totais da carcaça (Maschio & Raszl, 2012), com considerável perda econômica para os produtores.

Para controle e prevenção de infecções, a terapia antimicrobiana é comumente utilizada (Mantilla et al., 2008), cujo uso de antimicrobiano como promotor de crescimento é

regulamentado pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (BRASIL, 2006). Entretanto, recomenda-se que o uso de antimicrobiano na produção animal e saúde humana devem ser prudentes (WHO, 2013).

Na avicultura, o uso de antimicrobianos é comumente utilizado como promotor de crescimento em dosagem subterapêutica, considerado eficiente, por melhorar o ganho de peso e conversão alimentar e reduzir a mortalidade. No entanto, existe uma crescente preocupação que o uso de antimicrobianos na alimentação animal em doses subclínicas atue como fator de risco à saúde pública, devido a presença de resíduos em produtos animais para o consumo humano, que podem produzir reações alérgicas, toxicidade ou indução de surgimento de resistência bacteriana (Santos et al., 2005).

A elevada resistência aos antimicrobianos sintéticos em *E. coli* oriunda de frangos de corte apresenta-se como indicativo da existência de seleção na microbiota nas aves (Korb et al., 2015; Guimarães et al., 2015). Há evidências de que as resistências aos antimicrobianos em bactérias de frangos de corte possam ser transferidas para o ser humano por ingestão de alimentos contendo resíduos de fármacos ou material fecal-oral (Mantilla et al. 2008; Johnson et al., 2007). A emergência de fenótipos de resistência de relevância clínica e a multirresistência em cepas de *E. coli* de origem animal ilustram a gravidade do problema (Allen et al., 2010).

Neste contexto, a indústria de alimentos busca opções de substituição dos métodos tradicionais de controle de microrganismos nos alimentos, dentre os mais estudados estão à utilização de compostos antimicrobianos naturais (Devlieghere et al., 2004). Entre as plantas com potencial uso destaca-se a *Lippia origanoides* (Kunth) (Verbenaceae) e a *Agave sisalana* (Perrine) (Agavaceae).

L. origanoides é conhecida popularmente como alecrim-pimenta, alecrim do nordeste, alecrim de tabuleiro (Martins et al., 2003), sua composição tem cerca de 60% de timol ou uma mistura de timol e carvacrol, ambos agentes antimicrobianos, além de outros

componentes químicos como flavonóides e quinonas (Lorenzi & Matos, 2002), sendo citada na Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS (RENISUS) (Brasil, 2009).

A atividade antimicrobiana do óleo essencial e de extratos de *L. origanoides* contra vários fungos, bactérias e outros microrganismos já foram comprovados por diversos autores (Wange, 2014; Fernandes et al., 2012; Reis et al., 2011; Silva et al., 2010; Cavalcanti et al., 2010; entre outros). Sua utilização na medicina veterinária deve ser considerada como uma alternativa de grande viabilidade econômica e sustentável (Andrade et al., 2014).

A planta *A. sisalana* popularmente conhecida como sisal, apresenta importância econômica para a região nordeste do Brasil, responsável por mais de 78% da produção mundial de sisal. Contudo, o aproveitamento é de aproximadamente 5%, sendo o restante descartado na forma de resíduo (Branco et al, 2010). A atividade biológica do extrato bruto das folhas e do extrato bruto do resíduo de *A. sisalana* foi avaliada e demonstrou eficácia anti-helmíntica (Botura et al., 2011) e antifúngica (Morais et al., 2010). Entretanto faz-se necessário conhecer sua propriedade antibacteriana, estabelecendo uma correlação entre esse potencial e a composição química e ainda potencializar o aproveitamento dos resíduos da *A. sisalana* de modo a possibilitar maior agregação de valor à produção sisaleira no Estado da Bahia.

Não obstante, diante da importância da cadeia produtiva de carne de frango, os riscos à saúde do consumidor oferecido pelo potencial zoonótico e a resistência de cepas de *Escherichia coli* patogênica a utilização de compostos naturais configura-se como uma possibilidade promissora, podendo, desta maneira, reduzir os impactos advindos do uso de antibióticos. Contribuindo, desta forma, com o desenvolvimento de novas tecnologias no manejo de produção avícola, que permitirá a garantia da inocuidade dos cortes de frango, e conseqüentemente, o aumento da estabilidade durante o armazenamento.

Neste contexto, o presente estudo objetivou-se avaliar o potencial antibacteriano de óleo essencial extraído de folhas e inflorescência de *Lippia origanoides* e o extrato de *Agave*

sisalana frente à *Escherichia coli* patogênica oriunda do ambiente e insumos de aviários, lesão de celulite e fígado de frango.

2. Metodologia

2.1 Microrganismos

Para avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos naturais utilizou-se cepas de *Escherichia coli* patogênica isoladas a partir de etapas do processo produtivo de carne de frango por meio de método rápido de contagem em placas Petrifilm™ (3M Company), utilizando a placa Petrifilm EC, conforme recomendações do fabricante (AOAC 998.8). Para as análises em amostras de água, a presença ou ausência de *Escherichia coli* em 100 mL foi realizada por meio do método rápido cromogênico ReadyCult® (Merck), conforme orientações do fabricante.

Foram selecionadas 5 cepas de *Escherichia coli* patogênica positivas para os genes *iss* e *iutA*, isoladas dos insumos do frango (água e ração) ambiente produtivo (cama), lesão de celulite e fígado, e 01 cepa padrão de *Escherichia coli* (ATCC 25922), adquirido da bacterioteca do Instituto Nacional de Controle de qualidade em Saúde (INCQS/FIOCRUZ).

Os isolados foram identificados geneticamente a partir da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) cujas características dos *primers* estão descritas na Tabela 1.

TABELA 1 - Características dos *primers* utilizados para a PCR em insumos e ambiente de aviários, celulite e fígado de frangos de um abatedouro avícola do Recôncavo da Bahia.

Gene	Sequência de oligonucleotídeos	Amplicom (PM)	Função
iss*	GTGGCGAAAAGTAGTAAAACAGC	760	Resistência ao soro
	CGCCTCGGGGTGGATAA		
iutA**	GGCTGGACATCATGGGAAGCTGG	302	Aquisição de ferro
	CGTCGGGAACGGGTAGAATCG		

* Fonte: Knöbl et al. (2012) ** Fonte: Johnson et al. (2008). PM-Peso Molecular

Para realização dos testes de atividade antimicrobiana, as cepas foram reativadas 18 horas antes do experimento, em placas de petri contendo o meio ágar nutriente e incubadas a $36 \pm 1^\circ\text{C}$.

A suspensão bacteriana foi padronizada na concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC/mL⁻¹, com auxílio de espectrofotômetro, Spectrum, com comprimento de onda 625 nm, cujo limite de leitura aceitável que variou entre 0,08 e 0,10.

2.2 Compostos naturais extraídos de plantas

Foram utilizados no presente estudo óleo essencial de folhas e inflorescência de *Lippia origanoides* (Kunth) (alecrim-pimenta) e o extrato de *Agave sisalana* (Perrine) (sisal).

O cultivo da planta *L. origanoides* foi realizado entre janeiro a março do ano 2014, conduzido na Unidade Experimental do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana-UEFS, Bahia. Esta unidade situa-se a 234 metros de altitude, na latitude de 12°16'00" Sul e longitude de 38°58'00" Oeste. Durante o período de cultivo foi registrado pluviosidade média de 750 mm por ano e temperatura variando em torno de 26° C. Segundo a classificação de Köppen, o clima do local de cultivo é do tipo BSh, semiárido quente.

A composição química do óleo essencial foi determinada por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM), em cromatógrafo Shimadzu CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas CG/MS-QP 2010 Shimadzu, coluna WCOT de sílica fundida, 30 m x 0,25 µm, injetor CP-1177, temperatura do injetor 220°C, gás de arraste Hélio (1mL/min), temperatura da interface de 240°C, temperatura da fonte de ionização de 240°C, energia de ionização 70 eV, corrente de ionização 0,7 kV e programa de temperatura do forno 60°C a 240°C (3°C/min), 240°C (20min). Os componentes foram identificados através da comparação dos espectros de massas obtidos com os da biblioteca do equipamento e por comparação dos Índices de Kovats (IK) calculados com a literatura (Adams, 1995) empregando uma série homóloga de hidrocarbonetos.

O óleo essencial e sua composição química foram obtidos no Laboratório de Fitoquímica do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da

Universidade do Recôncavo da Bahia (UFRB) com apoio do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

Para o preparo do extrato, o resíduo de sisal foi coletado no campo, no momento de desfibramento da folha, com a máquina de desfibramento tradicionalmente utilizada pelos produtores, no município de Valente, com o apoio da Associação de Desenvolvimento Sustentável e Solidário da Região Sisaleira - APAEB.

O resíduo, contendo mucilagem e líquido (a polpa da folha de sisal sem a fibra) foi prensado com uma prensa desenvolvida pelo Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, o líquido foi coletado em sacos de plástico e transportado refrigerado em caixas de isopor no mesmo dia, até o Laboratório de Microbiologia Agrícola da UFRB, congelado em freezer vertical a 4°C, até ser utilizado nos ensaios propostos neste projeto. A composição química do extrato de *Agave sisalana* serão realizados posteriormente.

2.3 Teste de Susceptibilidade aos antimicrobianos

2.3.1 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O óleo essencial de *L. origanoides* e o extrato de *A. sisalana* foram testados contra *Escherichia coli* patogênicas oriundas de insumos e ambiente de aviários, celulite e fígado de frangos e cepa padrão *Escherichia coli* ATCC 25922.

Para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi utilizado o ensaio de suscetibilidade por microdiluição em caldo recomendado pelo CLSI (2003), com adaptações, sendo que todos os testes foram realizados em triplicatas.

Inicialmente, os compostos naturais foram diluídos em Tween 80 a 10% de modo a obter uma solução estoque de 70 mg.mL⁻¹, a qual foi posteriormente esterilizada utilizando filtros de porosidade de 0,22µm.

Foram preparadas diluições seriadas na ordem de 35 mg.mL⁻¹ a 0,27 mg.mL⁻¹ dos compostos testados em placas de microtitulação de 96 poços. Em seguida, cada poço

recebeu 10 µL da suspensão de micro-organismo teste na concentração de $1,5 \times 10^6$ UFC.mL⁻¹. As placas foram incubadas à 37°C por 24 horas e a determinação da CIM foi feita pelo método colorimétrico utilizando 30 µL de resazurina 0,01%.

Como controles foram usados: gentamicina 10 mg.mL⁻¹, controle de viabilidade dos microrganismos, esterilidade do meio e influência dos solventes (Tween 80) sobre o crescimento microbiano. Cinco microlitros do conteúdo dos poços que mostraram atividade foram inoculados em ágar Müeller Hinton para determinação da concentração bactericida mínima (CBM). O crescimento bacteriano no meio de cultura contido na placa de Petri caracterizou o composto como tendo atividade bacteriostática, a ausência de crescimento, atividade bactericida.

3. Resultados e Discussão

A composição química do óleo essencial extraído de folhas de *L. origanoides* está representada na tabela 2. O componente majoritário foi o carvacrol (56,60%), seguido de p – Cimeno (6,27%), E-cariofileno (4,13%) e timol (4,10%).

Estudos mostram que as propriedades bactericidas de um óleo essencial podem ser atribuídas, dentre outros fatores, à presença de seus compostos majoritários ou a sinergia entre esses e os compostos minoritários identificados no óleo essencial (Burt, 2004; Bakkali et al., 2008).

Os compostos fenólicos dos óleos essenciais se ligam à bicamada fosfolipídica da membrana celular aumentando sua permeabilidade e promovendo o extravasando dos constituintes intracelulares ou danificando o sistema enzimático da célula (Moreira et al., 2005).

TABELA 2. Componentes químicos identificados no óleo essencial de *Lippia organoides* e seus respectivos índices de Kovats calculados (IKCalc), índices de Kovats da literatura (IKLit).

COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL			
Composição	IKcalc	IK Lit	%
(2E)-Hexenal + (3Z)-Hexenol			tr.a
Pent-4-enoato de etila	884	888	tr.a
α -Tujeno	930	930	0,53 \pm 0,15
α -Pineno	938	939	tr.a
Canfeno	954	954	0,33 \pm 0,06
1-Octen-3-ol	980	979	tr.a
Mirceno	992	990	0,93 \pm 0,15
α -Terpineno	1019	1020	0,70 \pm 0,17
ρ -Cimeno	1028	1024	6,27 \pm 0,40
Limoneno	1032	1029	0,20 \pm 0,12
γ -Terpineno	1063	1064	3,97 \pm 0,81
Linalool	1100	1196	2,53 \pm 0,61
Cânfora	1148	1146	1,10 \pm 0,00
Borneol	1169	1169	0,60 \pm 0,10
Terpinen-4-ol	1180	1177	0,53 \pm 0,06
Metil timileter	1238	1235	2,53 \pm 0,12
Timol	1296	1290	4,10 \pm 0,10
Carvacrol	1311	1299	58,60 \pm 2,23
Acetato de carvacrol	1376	1372	0,50 \pm 0,10
E-Cariofileno	1423	1419	4,13 \pm 0,50
α -Bergamoteno	1438	1434	tr.a
Aromadendreno	1442	1441	0,67 \pm 0,06
α -Humuleno	1457	1454	1,43 \pm 0,15
Biciclogermacreno	1500	1500	3,23 \pm 0,50
7-epi- α -Selineno	1521	1522	0,37 \pm 0,06
Espatuleno	1581	1578	2,20 \pm 0,35
Óxido de cariofileno	1586	1583	1,60 \pm 0,26
Viridiflorol	1594	1592	0,33 \pm 0,06
Total identificado			97,40

Diversos fatores contribuem para diferença na composição dos óleos essenciais de uma mesma espécie. Morais (2009) descreve que fatores genéticos, idade e alguns fatores climáticos e ambientais, podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários pelas plantas. Dependendo do ambiente em que a planta se encontra, os estímulos podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos, alterando o teor e a composição química dos óleos essenciais.

Somando-se a esses fatores, o processamento do óleo essencial em laboratório, horário de coleta são fatores imprescindíveis que precisam ser considerados a fim de manter a concentração e qualidade dos mesmos.

Em geral o óleo essencial das espécies de *Lippia* contém, como constituintes majoritários, os monoterpenos timol e carvacrol (Soares & Dias, 2013), que são componentes voláteis com atividades antimicrobiana (Maia & Andrade, 2009).

Santos et al. (2004) identificaram em seu estudo, o carvacrol (33,5–42,9%) como maior componente junto com γ -terpineno (8,0–10,5%), timol (5,1–8,4%), metil timol (6,1–8,7%) e p-cimeno (11,9– 15,8%) para o óleo de *L. origanoides*. Em contraposto, Queiroz et al. (2014) relataram que o timol foi o constituinte majoritário, com 48,70% e uma pequena quantidade do carvacrol (1,14%).

O carvacrol é sempre encontrado em plantas que contêm timol, mostrando inclusive uma espécie de mutualismo entre os dois compostos (SOTO, 1995).

Solomakos et al. (2008) descrevem a atuação dos óleos essenciais a partir da penetração do envelope celular e membrana plasmática, destruindo a camada de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidos, alterando sua permeabilidade. Essa alteração leva à perda de íons com perda do potencial de membrana, colapso da bomba de prótons e depleção de ATP, coagulação citoplasmática e clivagem de macromoléculas.

Os resultados para o teste de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* e o extrato de *Agave sisalana* estão descritos na tabela 3. Todas as cepas de *Escherichia coli* patogênica mostraram-se sensíveis frente ao óleo essencial de *Lippia origanoides*. Contudo, o extrato de *Agave sisalana* não mostrou efeito inibitório nas concentrações testadas, frente a todos os microrganismos.

TABELA 3. Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (CMB) determinada em mg.mL^{-1} de óleo essencial (OE) de *Lippia origanoides* e extrato de *Agave sisalana* contra ATCC 25922 e *Escherichia coli* patogênica isoladas de insumos e ambiente de aviários, celulite e fígado de frangos de um abatedouro avícola do Recôncavo da Bahia.

<i>Escherichia coli</i> PATOGENICA													
Compostos	ATCC 25922		AA		ALC		AC		AF		AR		
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	

OE de <i>Lippia origanoides</i>	1,09	1,09	0,54	4,37	0,54	4,37	0,54	2,18	0,54	2,18	0,54	1,09
Extrato <i>Agave sisalana</i>	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO	NO

AA – *E. coli* patogênica origem água; ALC - *E. coli* patogênica origem lesão de celulite; AC - *E. coli* patogênica origem cama; AF - *E. coli* patogênica origem fígado; AR - *E. coli* patogênica origem ração.
NO - Nenhum efeito inibitório observado

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) apresentada pelo óleo essencial extraído de folhas e inflorescência de *Lippia origanoides* foi de 0,54 mg.mL⁻¹ para as cepas de *Escherichia coli* patogênica isoladas de insumos e ambiente produtivo (água, ração e cama), lesão de celulite e fígado, considerada a atividade antimicrobiana do óleo como bacteriostática. A CIM para a cepa padrão (ATCC 25922) foi 1,09 mg.mL⁻¹, avaliada como bactericida. O óleo essencial de *L. origanoides* mostrou CBM de 4,37 mg.mL⁻¹ para os isolados de lesão de celulite e água, para as cepas oriunda do fígado e cama apresentaram CBM de 2,18 mg.mL⁻¹, enquanto para os isolados da ração e cepa padrão (ATCC 25922) a CBM foi 1,09 mg.mL⁻¹.

Para classificação da atividade antimicrobiana, Wange (2014) categorizou em 4 classes de acordo com a sua concentração inibitória mínima (CIM): uma atividade forte (CIM: <0,01 mg.mL⁻¹); uma atividade antimicrobiana forte a moderada (CIM: 0,01- 0,1 mg.mL⁻¹); uma atividade fraca a moderada (CIM: 0,1-1 mg.mL⁻¹); e uma atividade fraca (CIM:> 1 mg.mL⁻¹).

A partir da classificação referida anteriormente é possível afirmar que o óleo essencial extraído de folhas de *Lippia origanoides* obteve uma atividade antimicrobiana classificada como fraca para as cepas de *Escherichia coli* testadas. Contudo, vale ressaltar que ainda não existe um consenso sobre qual seria a CIM ideal de compostos naturais, de modo que os resultados encontrados são merecedores de atenção para estudos posteriores.

Souza et al. (2015) avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo de Alecrim-pimenta (*L. origanoides*) por meio da técnica de disco de difusão e obtiveram resultados que indicaram atividade inibitória forte a moderada frente a bactéria *Escherichia coli* isolada de amostras

fecais, de 49 aves de postura do setor de Avicultura do Instituto de Ciências Agrárias da UFMG (Montes Claros - MG). A atividade do óleo foi demonstrada pela CIM de $0,04 \text{ mg.mL}^{-1}$ e a atividade bactericida (CBM) frente ao microrganismo *E. coli* foi obtida na concentração de $0,16 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Sarrazin et al. (2015) ao avaliar a ação do óleo essencial extraído de *Lippia origanoides* frente a *Escherichia coli* mostraram valores de CIM que variaram de $0,00015 \text{ mg.mL}^{-1}$ a $0,00031 \text{ mg.mL}^{-1}$ e CBM $0,00125 \text{ mg.mL}^{-1}$. Os autores afirmam também que atividade antimicrobiana estudadas para amostras cultivadas em diferentes épocas do ano, permaneceu inalterada, permitindo o uso medicinal desta espécie de planta medicinal sem qualquer risco de perda ou ausência dos princípios ativos da planta.

Utilizando o teste de microdiluição em caldo, Sarrazin et al. (2012) avaliaram a ação antimicrobiana do óleo essencial extraído *L. origanoides* frente a cepa padrão *Escherichia coli* (ATCC 25922). O valor de CIM obtido foi de $1,15 \text{ mg.mL}^{-1}$.

Pinho et al. (2012), utilizando a técnica de difusão em ágar, não detectaram atividade inibitória frente a *E. coli* a partir do extrato alcoólico das folhas de alecrim-pimenta da espécie *Lippia sidoides*, o que pode estar relacionado à menor susceptibilidade das bactérias Gram-negativas a extratos vegetais.

Outro estudo, envolvendo amostras de alimentos, revelou que o óleo essencial de *Lippia sidoides* apresentou uma atividade antimicrobiana forte sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de queijo artesanal, a concentração inibitória mínima (CIM) encontrada foi de $0,013 \text{ mg.mL}^{-1}$ para todas as bactérias testadas e a concentração bactericida mínima (CBM) foi de $0,025 \text{ mg.mL}^{-1}$ (Castro et al. 2011).

Santurio et al. (2011) avaliaram amostras de *Escherichia coli*, sendo isoladas de fezes de aves e fezes de bovinos, o óleo essencial extraído de outra espécie de *Lippia* (*Lippia graveolens*) demonstrou atividade antimicrobiana fraca, apresentando CIM $1,50 \text{ mg.mL}^{-1}$ e CBM $2,173 \text{ mg.mL}^{-1}$.

No teste de concentração bactericida mínima (CBM) o óleo essencial de *Lippia sidoides* (alecim pimenta) apresentou efeito bactericida frente a cepas de *E. coli* isoladas de leite, destacando a atividade do óleo que ocorreu na concentração de 0,32 mg.mL⁻¹ (Costa et al., 2011).

A atividade antibacteriana apresentada pelo óleo de *Lippia origanoides* parece estar relacionada ao composto majoritário carvacrol.

Oliveira et al. (2007) avaliaram o efeito do óleo essencial extraído de *Lippia origanoides* contra fungos e bactérias (*Candida albicans*, *Candida parapsilosis*, *Candida guilliermondii*, *Cryptococcus neoformans*, *Trichophyton rubrum*, *Staphylococcus aureus*, *Lactobacillus casei* e *Streptococcus mutans*). Os autores relataram como constituinte majoritário o carvacrol e com este trabalho sugeriram que a atividade antimicrobiana descrita está relacionada a este composto.

Dorman & Deans, (2000) afirmam que carvacrol e eugenol e são os principais responsáveis pela ação bactericida/bacteriostática dos óleos essenciais. Khanjari et al. (2013) relataram que os terpenos timol e carvacrol possuem amplo espectro contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

O caráter hidrofóbico dos óleos essenciais provoca alteração na estrutura do envelope celular, e os compostos fenólicos, como timol, carvacrol e eugenol diminuem a fluidez e alteram o perfil lipídico da membrana celular bacteriana (Pasqua et al., 2007).

Saad et al. (2013) relataram que a ação do carvacrol resulta na alteração do gradiente de íons e atribuem tal efeito à capacidade do composto, quando desprotonado, de se ligar a cátions e transportá-los através da membrana celular.

Carvacrol e timol podem interferir no transporte de elétrons, absorção de nutrientes, síntese de ácidos nucleicos e também interagir com proteínas da membrana, causando deformação e prejudicando sua funcionalidade (Bajpai et al., 2008). A atividade inibitória dos óleos essenciais pode estar relacionada à composição química, configuração estrutural e

funcional das moléculas e possíveis interações sinérgicas entre os componentes identificados (Dorman & Deans, 2000).

Estudos referem a resistência e multirresistencia de cepas de *Escherichia coli* de origem aviária e nenhuma droga foi eficiente para todas as amostras bacterianas avaliadas (Zanatta et al., 2004; Bogaard et al., 2001).

Barros et al. (2012) avaliaram a atividade antimicrobiana de sete antimicrobianos sintéticos pertencentes a várias classes de drogas e demonstraram a existência de um percentual de amostras com coeficientes elevados da CIM, com multirresistência a vários antimicrobianos. Indicam a existência de perfil de multirresistência em 33 das 35 amostras estudadas. Os resultados observados por meio da CIM apresentaram resistência para a enrofloxacin e lincomicina (100%) e 74,2% a 94,2% de resistência aos demais antimicrobianos.

Diante deste contexto o óleo essencial de *Lippia origanoides* caracteriza-se uma alternativa economicamente viável para se assegurar a qualidade microbiológica deste produto e proporcionar uma segurança para o consumidor.

Entretanto, a variação das concentrações bactericida mínima (CBM) frente as diferentes cepas de *E. coli* indicam que as cepas isoladas dos insumos, ambiente produtivo, lesão de celulite e fígado, apresentaram uma resistência maior quando comparada a cepa padrão. O uso de antimicrobianos como promotores de crescimento pode justificar essa resistência.

Potencializando a relevância do presente estudo, ressalta-se que a identificação dos genes de virulência *iutA* e *iss* nas cepas de *E. coli* indicam potencial patogênico. Considerando que a presença desses genes plasmidais é significativamente mais frequentes em cepas de *Escherichia coli* patogênica para aves (APEC) e a associação entre eles pode aumentar o potencial de virulência (Johnson, et al. 2008; Delicato et al., 2003).

Ao avaliar a atividade antimicrobiana do extrato de *Agave sisalana* (Perrine) frente à *Escherichia coli* patogênica os resultados obtidos nas condições testadas não foram satisfatórios, não foi observada atividade antimicrobiana sobre os isolados e cepa padrão (ATCC 25922).

Salienta-se que estudos com extrato de *A. Sisalana* frente a bactérias ainda são escassos, mas, conforme demonstrado por outros trabalhos, essa espécie vegetal possui efeito antimicrobiano, destacando sua atividade antifúngica (Morais et al., 2010; Santos et al., 2009; Almeida, 2009;).

4. Conclusão

O óleo essencial extraído de folhas de *Lippia origanoides* apresentou atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli* patogênica e ATCC 25922, com atividade bactericida frente aos microrganismos testados. Tais resultados indicam o potencial de uso do óleo essencial dessa planta na avicultura industrial como produto alternativo aos antimicrobianos convencionais, os quais segundo a literatura induzem a seleção de cepas multirresistentes.

Desta forma, sugere-se a utilização de folhas de *L. origanoides* no ambiente produtivo de carne de frango com vistas na inibição do crescimento microbiano, visando a redução da taxa de condenação de carcaças e mortalidade, propiciando segurança ao consumidor.

Novos estudos devem ser realizados visando à aplicabilidade do óleo essencial de *Lippia origanoides* no processo produtivo de carne de frango, garantindo assim a segurança de sua utilização e aplicabilidade na indústria avícola.

Apesar do extrato de sisal não ter apresentado atividade antimicrobiana frente aos isolados testados, faz-se necessário estudos em diferentes condições de estudo com vistas a identificar o seu potencial antimicrobiano.

Agradecimentos

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (FAPESB) pela concessão de bolsa de estudos. À Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). Ao Laboratório de Fitoquímica e Laboratório de Microbiologia do Centro de Ciências Agrárias, Ambientais e Biológicas (CCAAB) da Universidade do Recôncavo da Bahia (UFRB) e Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS).

5. Referências

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4 ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 1995. 804p.

ALLEN, H. et al. Call of the wild: antibiotic resistance genes in natural environments. **Nature Reviews Microbiology**. v. 8. p.251-59, 2010.

ALMEIDA, E. C. S. L. **Ação antifúngica do resíduo líquido integral e fracionado do desfibramento da folha do sisal (*Agave sisalana*) sobre *Malassezia pachydermatis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Candida albicans***. 2013. 94p. Dissertação (Mestrado – Área de concentração Ciências Biológicas) – Instituto de biociências do Rio Claro. Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Rio Claro.

ANDRADE, V. A. et al. Atividade antimicrobiana, toxicidade aguda e crônica do óleo essencial de *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 34, n.12, p. 1153-1161, 2014.

BAJPAI, V. K. et al. Chemical composition and inhibitory parameters of essential oil and extracts of *Nandina domestica* Thunb. to control foodborne pathogenic and spoilage bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 125, n.2, p.117-22, 2008.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**. v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BARROS, M. R. et al. Resistência antimicrobiana e perfil plasmidial de *Escherichia coli* isolada de frangos de corte e poedeiras comerciais no Estado de Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 32, n. 5, p. 405-410, 2012.

BOGAARD, A. E. V. D. et al. Antibiotic resistance of faecal *Escherichia coli* in poultry, poultry farmers e poultrys laughters. **Journal Antimicrobiol Chemotherapy**, v. 47, n. 6, p. 763-771, 2001.

BOTURA, M. B. et al. In vitro ovicidal and 39 larvicidal activity of *Agave sisalana* Perr. (sisal) on gastrointestinal nematodes of goats. **Veterinary parasitology**, v. 192, n. 1-3, p. 211-7, 2013.

BRANCO, A. et al. D-Mannitol from *Agave sisalana* biomass waste. **Industrial Crops and Products**. v. 32, n. 3, p. 507-510, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento. Relatório Técnico. Portaria do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento, no 40, de 08 de janeiro de 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde RENISUS. Relação nacional de plantas medicinais de interesse ao SUS. Espécies vegetais. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 14 jan. 2016.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, n. 03, p. 223–253, 2004.

CASTRO, C. E. et al. Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.13, n.3, p. 293-297, 2011.

CAVALCANTI, S. C. H. et al. Composition and acaricidal activity of *Lippia sidoides* essential oil against two-spotted spider mite (*Tetranychus urticae* Koch). **Bioresource Technol.** v. 101, n. 2, p. 829 - 832, 2010.

CLSI, 2003. CLINICAL AND LABORATORY STANDARD INSTITUTE. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests, CLSI Document MO2-A10, v. 10. Wayne: Clinical and Laboratory Standard Institute, 2003.

COSTA, J. P. R. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim-pimenta e do extrato bruto seco do barbatimão diante de bactérias isoladas do leite. **Biotemas**. v. 24, n. 4, p. 1-6, 2011.

DELICATO; E. R. et al. Virulence associated genes in *Escherichia coli* isolates from poultry with colibacillosis. **Veterinary Microbiology**. v. 94, n. 2, p. 97-103, 2003.

DEVLIEGHERE, F. et al. New preservation technologies: possibilities and limitations. **International Dairy Journal**. v. 14, n. 4, p. 273-285, 2004.

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

FERNANDES, L. P. et al. Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends. **Food and bioproducts processing**. v. 90, n. C3, p. 425 - 432, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com>>. Acesso em: 30 jan. 2016.

FERREIRA, A. J.; KNÖBL, T. Colibacilose Aviária. In: BERCHIERI JR, et al. Doença das aves. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 197-205, 2009.

FERREIRA, T. Z. et al. Perdas econômicas das principais causas de condenações de carcaças de frangos de corte em Matadouros-Frigoríficos sob Inspeção Federal no Rio Grande do Sul, Brasil. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 40, n. 1, p. 1021-1026, 2012.

GUIMARÃES, R. A. et al. Caracterização filogenética molecular e resistência antimicrobiana de *Escherichia coli* isoladas de caprinos neonatos com diarreia. **Ciência Animal Brasileira**. v. 16, n. 4, p. 615-622, 2015

JOHNSON, J. R. et al. Antimicrobial drug-resistant *Escherichia coli* from humans and poultry products, Minnesota and Wisconsin, 2002-2004. **Emerging Infectious Diseases Journal**. v. 13, n. 6, p. 838-846, 2007.

JOHNSON, T. J. et al. Evolution of the *iss* gene in *Escherichia coli*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 8, p. 2360–2369, 2008.

JOHNSON, T.J. et al. Identification of Minimal Predictors of Avian Pathogenic *Escherichia coli* Virulence for Use as a Rapid Diagnostic Tool. **Journal of Clinical Microbiology**. v. 46, n. 12, p. 3987–3996, 2008.

KHANJARI, A. et al. Combined effect of N,O-carboxymethyl chitosan and oregano essential oil to extend shelf life and control *Listeria monocytogenes* in raw chicken meat fillets. **LWT - Food Science and Technology**. v. 53, n. 1, p. 94–99, 2013.

KNÖBL, T. et al. Prevalence of Avian Pathogenic *Escherichia coli* (APEC) Clone Harboring *sfa* Gene in Brazil. **The Scientific World Journal**. v. 2012, 7 p., 2012. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3361264/pdf/TSWJ2012-437342.pdf>> . Acesso em: 13 mai. 2015.

KORB, A. et al. Tipagem molecular e resistência aos antimicrobianos em isolados de *Escherichia coli* de frangos de corte e de tratadores na Região Metropolitana de Curitiba, Paraná. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v. 35, n. 3, p. 258-264, 2015.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. 2. ed. Nova Odessa, SP: Plantarum, 2002, 512 p.

MAIA, J. G. S.; ANDARDE, E. H. A. Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils. **Química Nova**. v. 32, n. 3, p. 595-622, 2009.

MANTILLA, S. et al. Resistência antimicrobiana de bactérias do gênero *Listeria* spp. isoladas de carne moída bovina. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v. 45, n. 2, p. 116-121, 2008.

MARTINS, E. R.; CASTRO, D. M.; CASTELLANI, D. C.; EVANGELISTA, D. J. **Plantas medicinais**. 1. ed. Viçosa: Editora: UFV, 2003, 220p.

MASCHIO, M. M.; RASZL, S. M. Impacto financeiro das condenações post-mortem parciais e totais em uma empresa de abate de frango. **E-tech: Tecnologias para Competitividade Industrial**, Florianópolis, Ed. esp. alimentos, p. 26-38, 2012.

MORAIS, L. A. S. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. **Horticultura Brasileira**. v. 27, n. 2, p. 4050-4063, 2009.

MORAIS, M. S. et al. Eficiência dos extratos de alho e agave no controle de *Fusarium oxysporum* S. **Revista Brasileira de Agroecologia**. v. 5, n. 2, p. 89-98, 2010. Disponível em: <<http://www.aba-agroecologia.org.br/revistas/index.php/rbagroecologia/article/view/9580/6700>>. Acesso em 24 set. 2014.

- MOREIRA, M. R. et al. Inhibitory parameters of essential oils to reduce a foodborne pathogen. **LWT - Food Science and Technology**. v. 38, n, 5, p. 565-570, 2005.
- OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H. B. K. **Food Chemistry**. v. 101, n. 1, p. 236-240, 2007.
- PASQUA, R. et al. Membrane toxicity of antimicrobial compounds from essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, n. 12, p. 4863-4870, 2007.
- PINHO, L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**. v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.
- QUEIROZ, M. R. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia origanoides* frente à *Staphylococcus* sp. isolados de alimentos de origem animal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v. 16, n.3, p. 737-743, 2014.
- REIS, F. D. et al. Use of *Carnobacterium maltaromaticum* cultures and hydroalcoholic extract of *Lippia sidoides* Cham. against *Listeria monocytogenes* in fish model systems. **International Journal of Food Microbiology**. v. 146, n. 3, p.228 - 234, 2011.
- SAAD, N. Y. et al. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 28, n. 5, p. 269-279, 2013.
- SANTOS, E. C. et al. Uso de aditivos promotores de crescimento sobre o desempenho, características de carcaça e bactérias totais do intestino de frangos de corte. **Ciência e agrotecnologia**. v. 29, n.1, p. 223-231, 2005.
- SANTOS, F. J. B. et al. Composition and biological activity of essential oils from *Lippia origanoides* H.B.K. **Journal of Essential Oil Research**. v. 16, n. 5, p. 504–506, 2004.
- SANTOS, J. D. G. et al. Antimicrobial activity of *Agave sisalana*. **African Journal of Biotechnology**. v. 8, n. 22, p. 6181-6184, 2009.
- SANTURIO, D. F. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**. v. 41, n.6, p. 1051-1056, 2011.
- SARRAZIN, S. L. F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**. v. 134, n. 3, p. 1474–1478, 2012.
- SARRAZIN, S. L. et al. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Molecules**. v. 20, n. 2, p. 1860-1871, 2015.
- SILVA, V. A. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham. sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 12, n. 4, p. 452-455, 2010.
- SOARES, B. V.; DIAS, M. T. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. **Biota Amazônia**. v. 3, n. 1, p. 109-123, 2013.

SOLOMAKOS, N. et al. The antimicrobial effects of thyme essential oil, nisin, and their combination against *Listeria monocytogenes* in minced beef during refrigerated storage. **Food Microbiology**. v. 25, n. 1, p. 120-127, 2008.

SOTO, F. S. Essential oil variability of *Thymus zygis* growing wild in southeastern Spain. **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 40, n. 3, p. 819-825, 1995.

SOUZA, D. S. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Lippia origanoides* e *Lippia rotundifolia* frente a enterobactérias isoladas de aves. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecologia**. v. 67, n. 3, p. 940-944, 2015.

VERAS, H. N. H. et al. Synergistic antibiotic activity of volatile compounds from the essential oil *Lippia sidoides* and thymol. **Fitoterapia**, v. 83, n. 3, p. 1-5, 2012.

WANG, Y. C. Medicinal plant activity on Helicobacter pylori related diseases. **World Journal Gastroenterology**. v. 20, n. 30, p. 10368-82, 2014.

WHO 2013. Anti-microbial resistance. Disponível em <<http://www.who.int/trade/glossary/story004/en/>> Acesso em 13 jan. 2016.

ZANATTA, G. F. et al. Suscetibilidade de amostras de *Escherichia coli* de origem aviária a antimicrobianos. **Arquivos do Instituto Biológico**. v. 71, n. 3, p. 283-286, 2004.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O Brasil possui posição de destaque na exportação de frangos, contudo para que a indústria avícola mantenha a liderança faz-se necessário a oferta de alimentos seguros para os consumidores. Pautado nos resultados oriundos desta pesquisa e revisão de literatura fica evidenciado a importância de adoção de medidas de controle microbiano no ambiente e insumos de aviários, tendo em vista a possível relação de contaminação cruzada. Salientando o manejo adequado das camas e sua reutilização, por configurar uma porta de entrada de bactérias em aves.

Considerando a presença de genes de virulência de *Escherichia coli* no ambiente e insumos faz-se necessário a implementação de medidas eficazes com vistas a redução microbiana considerando o potencial patogênico das cepas.

Neste contexto, medidas profiláticas são requeridas na indústria avícola, contudo o uso de antimicrobianos como promotor de crescimento, visando o controle da população microbiana põe em risco à saúde pública, em decorrência da resistência adquirida as substâncias utilizadas. Esse fato desperta o interesse a alternativas substitutivas que não comprometa a saúde animal e humana, como o uso de compostos naturais extraídos de plantas.

No presente estudo ficou evidenciado o potencial antimicrobiano de óleo essencial extraído de *Lippia origanoides* (Kunth), porém é necessária a continuidade de estudos que fomentem esse potencial com o objetivo de melhorar a avicultura moderna.