



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS**

Adriana Nogueira Figueiredo

**ATIVIDADE ANTI-*Salmonella* E ANTIOXIDANTE DE UMA BLEND DE
ÓLEOS ESSENCIAIS PARA USO EM DIETAS DE FRANGOS DE CORTE**

**ANTI-*Salmonella* AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF ESSENTIAL
OILS BLEND FOR USE IN BROILER DIETS**

Campinas, 2017

Adriana Nogueira Figueiredo

**ATIVIDADE ANTI-*Salmonella* E ANTIOXIDANTE DE UMA BLEND DE
ÓLEOS ESSENCIAIS PARA USO EM DIETAS DE FRANGOS DE CORTE**

**ANTI-*Salmonella* AND ANTIOXIDANT ACTIVITIES OF ESSENTIAL
OILS BLEND FOR USE IN BROILER DIETS**

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de
Engenharia de Alimentos – UNICAMP, para a
obtenção do título de Doutora em Ciência de
Alimentos

Orientadora: Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

Este exemplar corresponde à versão final da tese de
doutorado defendida por Adriana Nogueira Figueiredo e
orientada pela Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte

Campinas, 2017

Agência(s) de fomento e nº(s) de processo(s): CNPq, 142132/2012-8
ORCID: <http://orcid.org/0000-0002-5641-286X>

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Engenharia de Alimentos
Claudia Aparecida Romano - CRB 8/5816

F469a Figueiredo, Adriana Nogueira, 1973-
Atividade anti-*Salmonella* e antioxidante de uma blenda de óleos essenciais para uso em dietas de frangos de corte / Adriana Nogueira Figueiredo. – Campinas, SP : [s.n.], 2017.

Orientador: Marta Cristina Teixeira Duarte.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Óleos essenciais. 2. Timol. 3. Eugenol. 4. antioxidantes. 5. Frangos de corte. I. Duarte, Marta Cristina Teixeira. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em outro idioma: Anti-*Salmonella* and antioxidant activities of essential oils blend for use in broiler diets

Palavras-chave em inglês:

Essential oils

Thymol

Eugenol

Antioxidants

Broilers

Área de concentração: Ciência de Alimentos

Titulação: Doutora em Ciência de Alimentos

Banca examinadora:

Marta Cristina Teixeira Duarte [Orientador]

Carmen Josefina Contreras Castillo

Carolina Siqueira Franco Picone

Jacqueline Boldrin de Paiva

José Fernando Machado Menten

Data de defesa: 11-10-2017

Programa de Pós-Graduação: Ciência de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Marta Cristina Teixeira Duarte - Orientadora

Depto. Microbiologia/CPQBA/UNICAMP – Campinas/SP

Profa. Dra. Carmen Josefina Contreras Castillo – Membro Titular

Depto. Agroindústria, Alimentos e Nutrição/ESALQ/USP – Piracicaba/SP

Profa. Dra. Carolina Siqueira Franco Picone – Membro Titular

Depto de Alimentos e Nutrição/FEA/UNICAMP – Campinas/SP

Dra. Jacqueline Boldrin de Paiva – Membro Titular

BIOCAMP Laboratórios Ltda. – Campinas/SP

Prof. Dr. José Fernando Machado Menten – Membro Titular

Depto. de Zootecnia/ESALQ/USP – Piracicaba/SP

A Ata da Defesa, assinada pelos membros da Comissão Examinadora, consta no processo de vida acadêmica do aluno.

Nossa Senhora sempre presente e conduzindo. Gratidão e fé

Ofereço

Para as minhas filhas, Malu e Mari, pela paciência e compreensão por cada vez que a mamãe não pode brincar ou emprestar o computador para jogar Animal Jam.

Ofereço também

Ao Flavio, sempre, sempre incentivando e acreditando...obrigada. Meu amor.

Agradecimentos

À UNICAMP e ao CPQBA por possibilitarem a realização deste trabalho e ao CNPq pela bolsa de estudos.

À minha orientadora, Marta, que muito mais do que orientadora, foi uma amiga que a vida me deu. Obrigada por cada palavra de incentivo nos mais diversos momentos que dividimos.

À amiga Rê Duarte, sem você a tese não existiria! Agradecida sempre.

À pesquisadora e amiga Adriana Ayres Pedroso por todo ensinamento, paciência e detalhe nas explicações com as análises de *Salmonella*. E viva o Skype!

Ao professor Menten, da ESALQ, por abrir as portas, sempre.

À professora Aline Racanicci, da UNB, competente e amiga, pela ajuda, disponibilidade e orientação nas análises de oxidação da carne.

À banca examinadora pela contribuição nas sugestões de melhoria da tese apresentada.

A cada pessoa que contribuiu para cada uma das várias etapas deste trabalho. Sem vocês não seria possível: Beatriz Ângelo e Camila Delarmelina (laboratório), Rodney Rodrigues (microencapsulação), Adilson Sartorato (cromatografia), Vânia Nakajima (antioxidantes), Thais Coutinho e Daniel Bruno da Cargill (dietas experimentais e estatística), Valéria Jardim (teste de pH), professora Carmen Contreras (câmara fria), professora Urara Kawazoe (instalação experimental), Flavio Longo e Renata Duarte (ensaio com *Salmonella*), Glaucia Napty e companhia (experimento com os frangos de corte), Cristiane Lima e Thais Chiozzini (análises de TBARs), Oneida e equipe do CBO (análises na carne). Meus mais sinceros agradecimentos.

Aos queridos amigos de Campinas que me ajudaram de diferentes maneiras neste longo processo, em particular minha estimada comadre Lilian.

Ao apoio da minha Grande família e, em especial, aos meus pais e as marcas que me deixam e já deixaram para construir o meu ser. Obrigada com muito amor!

RESUMO

A restrição crescente do uso de aditivos sintéticos nas formulações para animais de criação instigou o objetivo deste trabalho, que foi avaliar o uso de uma blenda dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Ocimum gratissimum* (BOE) na dieta de frangos de corte, por suas reconhecidas atividades antimicrobianas e antioxidantes. Primeiramente, foi determinado o perfil químico dos óleos essenciais das espécies aromáticas por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas – CG-EM. Em seguida, a partir da determinação da concentração mínima inibitória (MIC), de 700 µg/mL para *Salmonella enterica* serovar Enteritidis, estabeleceu-se a BOE na proporção 1:3, considerando-se 1 parte de timol+carvacrol e 3 partes de eugenol presentes nos óleos e que foi utilizada nos ensaios subsequentes. Para avaliar *in vitro* a cinética de crescimento de *S. Enteritis* MB089-R (resistente à rifamicina, 64 µg/mL) na presença da BOE, inoculou-se em caldo LB, 0, 70, 140 e 700 µg/mL da mesma, constatando-se serem estes níveis eficientes em diminuir a taxa de crescimento bacteriano ($p < 0,05$). A seguir, a BOE foi microencapsulada (20% óleo + 80% maltodextrina) e adicionada à dieta de frangos de corte em diferentes níveis (0, 70, 140 e 700 ppm), o que não prejudicou o desempenho das aves ($p > 0,05$). Posteriormente, frangos de corte de 2 dias de idade foram desafiados oralmente com 10^5 UFC de *S. Enteritis* MB089-R e alimentados com as mesmas dietas usadas no ensaio de desempenho. Observou-se redução da quantidade de *S. Enteritidis* na microbiota cecal e das excretas dos frangos que consumiram dietas com 700 ppm de BOE microencapsulado, principalmente após 9 dias da inoculação. Nos ensaios de atividade antioxidante, frangos de corte foram alimentados com as dietas dos ensaios anteriores, incluindo o controle negativo etoxiquim, 150 ppm. Aos 35 dias de idade, 8 aves por tratamento foram selecionadas aleatoriamente e abatidas para retirada do peito e sobrecoxa. O valor de pH da carne foi medido 24 h após o abate, sem efeito significativo entre os grupos. Os peitos e sobrecoxas de cada grupo foram moídos separadamente com adição de 0,50 % de sal. Duas almôndegas de carne pré-cozidas de cada tratamento foram analisadas para os produtos secundários de oxidação lipídica (TBARS), em duplicata, nos dias 0, 2, 4 e 7 de armazenamento (4 °C). Além disso, cerca de 1,5 kg de carne de peito e sobrecoxa das aves do grupo sem adição de aditivos antioxidantes foi tratado com 0, 150 ppm de BHT, 70 e 140 ppm da BOE microencapsulada. Em geral, as almôndegas de carne de frangos alimentados com grupos suplementados apresentaram valores de TBARS inferiores aos do grupo sem aditivos antioxidantes, sendo este efeito mais pronunciado na carne de sobrecoxa.

O maior nível de inclusão (700 ppm da BOE microencapsulada) mostrou maior capacidade em conter os processos oxidativos das almôndegas refrigeradas ($p < 0,05$). No ensaio com incorporação dos produtos na carne, a inclusão de 70 e 140 ppm da BOE foram, respectivamente, eficientes para prevenir a oxidação lipídica em amostras pré-cozidas do peito e da sobrecoxa, quando comparadas com o grupo controle ($p < 0,05$). A BOE de *T. vulgaris* e *O. gratissimum* na forma microencapsulada mostrou potencial tanto anti-*Salmonella* como antioxidante, podendo ser proposta para inclusão em dietas para frangos de corte e em formulações cárneas.

Palavras chave: óleos essenciais, timol, eugenol, *Salmonella*, antioxidantes, frangos de corte.

ABSTRACT

The increasing restriction of the use of synthetic additives in the diets for animal production instigated the objective of this research to evaluate of a blend of essential oils from plants with recognized antimicrobial and antioxidant activities in the broilers diet. First, through the gas chromatography technique, the chemical profile of the essential oils of the aromatic species from *Thymus vulgaris* and *Ocimum gratissimum* was determined. The minimum inhibitory concentration (MIC) of 700 µg/mL for *Salmonella enterica* serovar Enteritidis was defined and established the proportion of 1: 3, 1 part of thymol + carvacrol and 3 parts of eugenol (EOB) to be further explored in the subsequent assays. In order to evaluate the growth kinetics of *S. Enteritis* MB089-R (rifamycin resistant, 64 µg/mL), LB broth was inoculated with 0, 70, 140 and 700 µg/mL of EOB and the growth curves determined. Levels of EOB were efficient to decrease the bacterial growth rate ($p < 0.05$). The microencapsulated EOB (20% oil + 80% maltodextrin) was added to the diet of broilers at different levels (0, 70, 140 and 700 ppm EOB), which did not affect the performance of the birds ($p > 0.05$). Subsequently, 2 day old broilers were orally challenged with 10^5 UFC of *S. Enteritis* MB089-R and fed diets containing the same levels of microencapsulated EOB used in the performance experiment. It was observed a reduction of the amount of *S. Enteritidis* present in the cecal and excreta microbiota of chickens fed diets containing 700 ppm of microencapsulated EOB, mainly 9 days after inoculation ($p < 0.05$). For the antioxidant activity, chickens were fed the same diets from the previous assays, including the negative control (150 ppm ethoxyquim). At 35 days of age, 8 birds per treatment were randomly selected and euthanized to collect breast and thigh meat. The pH value of the meat was measured 24 hours after slaughter with no significant effect ($p > 0.05$) between groups. A breast and thigh *pools* of each group was minced, weighted and added 0.50% of salt. Two precooked meat balls from each treatment were analyzed in duplicate on days 0, 2, 4 and 7 of storage (4°C) for secondary lipid oxidation products (as TBARS). In addition, circa of 1.5 kg of breast and thigh meat from the group without antioxidant additives were treated with: 0; 150 ppm of BHT; 70 and 140 ppm of EOB mixed in the meat. In general, meatballs from chickens feed supplemented groups showed lower TBA-value than those from group without antioxidant additives and this effect was more pronounced in the thigh than breast meat. The highest inclusion level (700 ppm EOB) presented the best results for the oxidation processes in the refrigerated meatballs ($p < 0.05$). In the incorporation in the meat assay, the mix of 70 and 140 ppm of EOB, respectively,

were efficient to prevent lipid oxidation in precooked breast and thigh samples when compared to control group ($p < 0.05$). The EOB from *T. vulgaris* and *O. gratissimum* showed potential both anti-*Salmonella* and antioxidant activities, and could be proposed for inclusion in diets for broilers and in a meat formulation.

Key words: essential oil, thymol, eugenol, *Salmonella*, antioxidants, broilers.

SUMÁRIO

<i>CAPÍTULO 1: Introdução geral e Objetivos.....</i>	14
1. Introdução geral.....	15
2. Objetivos.....	17
3. Organização da tese em capítulos.....	18
4. Referências.....	19
 <i>CAPÍTULO 2: Revisão bibliográfica.....</i>	21
1. Introdução.....	22
2. <i>Salmonella</i> : uma preocupação global.....	22
3. Oxidação lipídica: um desafio na carne de frango.....	25
4. Os óleos essenciais.....	29
5. Microencapsulação de óleos essenciais.....	33
6. <i>T. vulgaris</i> e <i>O. gratissimim</i> e suas propriedades anti- <i>Salmonella</i>	36
7. <i>T. vulgaris</i> e <i>O. gratissimim</i> e suas propriedades antioxidantes.....	40
8. Referências.....	44
 <i>CAPÍTULO 3: Effects of essential oils on Salmonella growth.....</i>	63
Effects of essential oils on <i>Salmonella</i> Enteritidis growth: <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> assays.....	64
Abstract.....	64
Introduction.....	65
Material and methods.....	66
Commercial and Experimental Essential Oils.....	66
Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC–MS).....	66
Bacterial Strain.....	67
Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Assay.....	67
<i>In vitro</i> <i>Salmonella</i> Growth Rate.....	68
Microencapsulation of Essential Oil	69
Diet and Experimental Design.....	69
Statistical Analysis.....	71
Results and discussion.....	71
Chemical Analysis of the Essential Oils.....	71

Minimum Inhibitory Concentration.....	74
<i>In vitro</i> Growth Rate of <i>S. Enteritidis</i>	77
Growth Performance of Broilers.....	78
<i>Salmonella</i> Colonization and Persistence in Chickens.....	79
Conclusion.....	84
References.....	84
 CAPÍTULO 4: Micropartículas de óleos essenciais inibindo a oxidação lipídica em	
almôndegas de frangos: estudos <i>in situ</i> e <i>in vivo</i>	93
Micropartícula de óleos essenciais e seus usos.....	94
Resumo.....	94
Abstract.....	95
1. Introdução.....	95
2. Material e Métodos.....	98
2.1. Óleos essenciais.....	98
2.2. Determinação do teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante pela capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC).....	98
2.3. Avaliação do consumo e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com níveis crescentes da BOE.....	99
2.3.1. Manejo experimental.....	99
2.3.2. Análise de pH na carne dos frangos.....	101
2.3.3. Preparo das amostras para os ensaios de vida de prateleira.....	102
2.3.4. Incorporação da BOE na formulação das almôndegas.....	104
2.3.5. Oxidação lipídica - Análise de TBARS.....	104
2.3.6. Caracterização das almôndegas de carne de frango pré-cozidas.....	106
2.4. Análise Estatística.....	106
3. Resultados e Discussão.....	107
3.1. Determinação de fenólicos totais e atividade antioxidante.....	107
3.2. Consumo de ração pelas aves alimentadas com os diferentes níveis da BOE.....	108

3.3. Rendimento de carcaça e pH da carne das aves alimentadas com a BOE.....	110
3.4. Incorporação do BOE na formulação cárnea e o efeito na estabilidade oxidativa..	112
3.5. Adição da BOE na dieta de frangos de corte e efeito na estabilidade oxidativa da carne.....	117
3.6. Perfil de ácidos graxos das carnes de aves alimentadas com diferentes tratamentos.....	126
4. Conclusões.....	129
5. Referências.....	129
 <i>CAPÍTULO 5: Discussão Geral.....</i>	 141
 <i>CAPÍTULO 6: Conclusão Geral.....</i>	 148
 <i>CAPÍTULO 7: Referências Bibliográficas.....</i>	 150
 <i>APÊNDICE 1: Análise química da blenda de óleos essenciais.....</i>	 180
1. Objetivos.....	181
2. Material e Métodos.....	181
3. Resultados	181
4. Referências.....	184
 <i>APÊNDICE 2: Microencapsulação da blenda de óleos essenciais.....</i>	 187
1. Objetivos.....	188
2. Material e Métodos.....	188
2.1. Processo de microencapsulação.....	188
2.2. Rendimento e avaliação do processo de encapsulação.....	190
3. Resultados	191
4. Referências.....	194
 <i>ANEXOS: Aprovações dos comitês de ética para pesquisa com animais.....</i>	 196

- CAPÍTULO 1 -

INTRODUÇÃO GERAL E OBJETIVOS

1. Introdução Geral

Estimativas para os próximos anos indicam um crescimento do número de habitantes, da urbanização e da renda da população mundial. Estes índices impulsionam o consumo de carne que, segundo as estatísticas da FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), entre os anos de 2015 e 2030 representará, em média, uma taxa de crescimento mundial de 1,5%. Dentre todos os tipos de carne, a de frango de corte é a que deverá representar o maior aumento, com uma taxa de crescimento de 2,4% para este período.

Neste cenário, o Brasil vem se destacando, pois se tornou o maior exportador mundial de carne de frangos desde 2004 e o segundo maior produtor, atrás somente de Estados Unidos (Associação Brasileira de Proteína Animal, ABPA, 2016). Medidas assertivas de manejo, ambiência, nutrição e sanidade colocaram o país no apogeu e foram fundamentais para manutenção e expansão de mercados consumidores nacionais e internacionais.

Entretanto, as restrições diante da presença de microrganismos patogênicos e produtos químicos usados de forma indevida dentro da cadeia de produção avícola são severas e abrangentes, com regulamentações e avaliações técnicas que apontam os impactos à sanidade, à produtividade animal e principalmente na segurança dos alimentos (LONGO; FIGUEIREDO, 2014). Este fato foi confirmado recentemente pela “Operação Carne Fraca”, deflagrada no cenário nacional e que coloca em risco toda a seriedade e competência das grandes empresas brasileiras exportadoras; embora alerte para a estrondosa preocupação com relação ao alimento consumido.

Ademais, por se tratar de um alimento altamente perecível, assim como os demais produtos cárneos, a conservação e transporte inadequados da carne de frango podem afetar de forma negativa seus atributos de qualidade, tornando-a indesejável do ponto de vista do consumidor e sendo um entrave na sua comercialização (CORRIER et al., 1999; WARRIS et al., 1999; MIN; AHN, 2005). O desafio em preservar as características do produto e prolongar sua vida de prateleira devem ser compreendidos e considerados nas várias etapas do processo que se inicia na fazenda e termina no prato do consumidor (LOGUE et al., 2003).

Uma das medidas utilizadas na produção animal para minimizar estes desafios na comercialização da carne de frango é o uso de aditivos sintéticos, como os antimicrobianos e antioxidantes adicionados nas dietas das aves e no preparo dos alimentos embutidos e prontos

para consumo (*ready-to-eat*), no caso de antioxidantes (LUCERA et al., 2012; ALAHAKOONA et al., 2015). Entretanto, nas últimas duas décadas uma série de medidas em vários países gerou uma conscientização mundial de que o uso de antibióticos como promotores de crescimento na dieta dos animais deveria ser abolido. Esta exigência vigora na Comunidade Europeia desde 2006 (European Food Safety Authority, EFSA) e vem sendo cobrada paulatinamente pela legislação brasileira com as diretrizes propostas pelo MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) assim como nos Estados Unidos (Food and Drug Administration, FDA, 2013). Aliado a esta realidade, há uma demanda de um público consumidor preocupado com saúde e segurança alimentar, que é contrário à criação de animais com o uso indiscriminado de aditivos químicos, tanto nas dietas como nos produtos cárneos. A consequência deste movimento na produção animal representa, nos dias de hoje, a retirada destes aditivos sintéticos da ração (como os antimicrobianos e antioxidantes), motivando a indústria de alimentos no desenvolvimento de produtos e estratégias que sejam alternativas.

Com isso, tanto empresas como universidades têm orientado seus esforços na busca por produtos naturais que substituam de forma efetiva estes compostos sintéticos. Dentre as opções existentes, plantas aromáticas e especiarias surgem como uma possibilidade de uso, uma vez que apresentam vários mecanismos intrínsecos de defesa com conhecidas ações antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, dentre outras (BURT, 2004; BOU et al., 2009). Estas plantas e seus constituintes biologicamente ativos, presentes em seus óleos essenciais ou voláteis, podem representar uma boa escolha ao uso de produtos sintéticos e melhoria do desempenho animal e qualidade da carne, o que pode ser feito através da inclusão nas dietas ou diretamente nos produtos cárneos, uma vez que são geralmente considerados seguros para uso (HASHEMI; DAVOODI, 2011).

Entretanto, pesquisas utilizando os óleos essenciais e/ou seus constituintes na alimentação animal e a eventual consequência sobre o desempenho, controle de patógenos e qualidade de carne ainda permanecem pouco exploradas e com muitas perguntas para serem respondidas. Por serem moléculas complexas é necessário entender o sinergismo, antagonismo de seus constituintes, qual melhor nível para cada atuação, se são e como são absorvidos no trato gastrointestinal, quais as melhores técnicas de preservação, como se comportam em diferentes matrizes alimentícias, dentre outras questões.

Dessa forma, estudos complementares se fazem necessários para dar sustentabilidade ao uso dos óleos essenciais na dieta animal, tanto para um maior entendimento na ação contra *Salmonellas*, como nos efeitos sobre a estabilidade oxidativa da carne. Além do mais, a prática da microencapsulação, que preserva de forma mais eficiente os compostos voláteis dos óleos essenciais e facilita a inclusão nas dietas comerciais, é pouco explorado para este tipo de pesquisa. Consequentemente, o desenvolvimento de um produto natural à base de óleos essenciais microencapsulados, para ser adicionado nas dietas das aves com atuação contra *Salmonella* spp. e, preservando as características da carne para prolongar sua vida útil, se torna desejável.

2. Objetivos

Os objetivos específicos deste estudo foram divididos em duas partes, sendo:

(1) Atividade anti-*Salmonella*: (a) caracterizar quimicamente os óleos essenciais das espécies aromáticas de *Thymus vulgaris* (T.v.) e *Ocimum gratissimum* (O.g) obtidos comercialmente e compará-los com aqueles colhidos no campo experimental em diferentes épocas do ano, (b) determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* destes óleos essenciais na forma pura e de blenda na proporção de 1:3, respectivamente de T.v:O.g, frente à cepas de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis isoladas de aves infectadas (c) tornar uma cepa de *Salmonella* Enteritidis resistente ao antibiótico rifampicina e avaliar a cinética de seu crescimento *in vitro* quando inoculada em meio de cultura com diferentes concentrações dos óleos essenciais, (d) microencapsular os óleos essenciais (BOE) e suplementar frangos de corte com níveis crescentes da BOE para avaliar o desempenho, (e) inocular aves com *Salmonella* Enteritidis resistente a rifampicina e avaliar a colonização intestinal durante 24 dias, através de análises do conteúdo cecal e fecal das aves.

(2) Atividade antioxidante: (a) quantificar os compostos fenólicos e a atividade antioxidante *in vitro* da blenda na proporção 1:3 de T.v:O.g. na forma líquida e microencapsulada (b) alimentar os frangos de corte com níveis crescentes de BOE e avaliar o pH da carne e o rendimento de peito, sobrecoxa e fígado das aves, (c) misturar na carne de peito e de sobrecoxa a BOE e compará-lo ao antioxidante sintético no controle da oxidação lipídica quando submetido ao processamento térmico, (d) verificar se a carne de peito e sobrecoxa de frangos alimentados

com BOE apresentam retardo no processo de oxidação lipídica, quando submetidas ao processamento térmico e armazenadas sob refrigeração, (e) analisar o perfil de ácidos graxos da carne dos frangos que consumiram dietas com diferentes níveis da BOE.

3. Organização da tese em capítulos

A indústria de alimentação animal está se confrontando com uma realidade de que o uso de aditivos sintéticos vem sendo proibidos de forma gradual na dieta dos animais. Alternativas naturais que englobam os estudos com óleos essenciais e suas multifunções são reconhecidas há muito tempo. Uma mesma molécula pode atuar em vários mecanismos de ação. Nesta linha de conhecimento e tendo informação das pesquisas conduzidas *in vitro* com os óleos essenciais e seus constituintes, elaboramos a hipótese deste trabalho: os óleos essenciais provenientes das espécies aromáticas de *Thymus vulgaris* e de *Ocimum gratissimum* poderiam ter ação em frangos de corte tanto no controle da *Salmonella* (atividade antimicrobiana) como na oxidação lipídica (atividade antioxidante). Inicialmente, avaliamos a atividade anti-*Salmonella in vitro*, apresentada no Capítulo 3, para estabelecer qual seria a proporção dos óleos essenciais e o nível de inclusão que utilizaríamos nos ensaios com frangos de corte. A partir destes resultados, o mesmo produto foi utilizado na forma microencapsulada em todos os ensaios, sendo determinadas progressivamente as fases de execução para confirmação ou não da hipótese. Assim, a tese foi estruturada da seguinte forma:

Capítulo 1: Introdução geral e objetivos

Capítulo 2: Revisão bibliográfica

Capítulo 3: Effects of essential oils on *Salmonella* growth

Neste capítulo foi realizado um estudo dos óleos essenciais de *T. vulgaris* e *O. gratissimum* na forma pura e em blenda e a ação no controle de *S. Enteritidis in vitro*. A partir destes resultados, foi possível avaliar o efeito da colonização deste patógeno no ceco dos frangos de corte alimentados com diferentes níveis de inclusão dos óleos essenciais. Os resultados estão apresentados nas normas para serem publicados na revista *Poultry Science*.

Capítulo 4: Micropartículas de óleos essenciais inibindo a oxidação lipídica em almôndegas de frangos: estudos *in situ* e *in vivo*

Este capítulo traz um estudo mais detalhado da ação antioxidante dos óleos essenciais de *T. vulgaris* e *O. gratissimum* e sua atuação quando adicionado na carne de frango e quando ingerido pelos frangos de corte. Os dados gerados nesta pesquisa resultaram na patente intitulada: Micropartícula antioxidante e seus usos.

Capítulo 5: Discussão geral

Capítulo 6: Conclusão geral

Capítulo 7: Referências bibliográficas

Apêndice 1: Análise química da blenda de óleos essenciais

Foi relatada a determinação química dos compostos e a quantificação dos componentes majoritários da blenda de óleos essenciais que gerou o produto avaliado tanto nos ensaios antimicrobianos como antioxidantes.

Apêndice 2: Microencapsulação da blenda de óleos essenciais

São apresentadas as etapas e as condições que foram necessárias para o processo de microencapsulação por *spray-dryer* da blenda de óleos essenciais e a avaliação de suas características. Este produto foi utilizado tanto nos ensaios antimicrobianos como antioxidantes.

4. Referências

ABPA, Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório anual. São Paulo, 2015. Disponível em <http://abpa-br.com.br/storage/files/versao_final_para_envio_digital_1925a_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web1.pdf>. Acesso em: 03 de abril de 2016.

ALAHAKOONA, A. U., et al. Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. Trends in Food Science & Technology, v. 45, p. 37–49, 2015.

BOU, R. et al. Dietary Strategies to Improve Nutritional Value, Oxidative Stability, and Sensory Properties of Poultry Products. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, v. 49, p. 800–822, 2009.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. International journal of food microbiology, v. 94, n. 3, p. 223–253, 2004.

- CORRIER, D. E., et al. Presence of Salmonella in the crop and ceca of broiler chickens before and after preslaughter feed withdrawal. *Poultry Science*, v.78, p.45-49, 1999.
- EFSA. European Food Safety Authority. *EFSA Journal*, 12(2), 3547, 2014.
- FAO. Food and Agriculture Organization of the United Nations. *World Agriculture: Towards 2015/2030. An FAO perspective...* Disponível em: <http://www.fao.org/docrep/005/y4252e/y4252e05b.htm>. Acesso em 13 de março de 2017.
- FDA. Food and Drug Administration. FDA Takes Significant Steps to Address Antimicrobial Resistance. Estados Unidos, 2013. Disponível em: <http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm378166.htm>. Acesso em: 20 de outubro de 2015.
- HASHEMI, S. R.; DAVOODI, H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. *Veterinary Research Community*, v.35, p.169-180, 2011.
- LOGUE, C. M. et al. The incidence of antimicrobial-resistant Salmonella spp. on freshly processed poultry from US Midwestern processing plants. *Journal of applied microbiology*, v. 94, n. 1, p. 16-24, 2003.
- LONGO, F.A.; FIGUEIREDO, A.N. Biossegurança adotada na cadeia de produção de rações. IN: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2014, Amparo/SP. Anais...Campinas/SP. FACTA, 2014.
- LUCERA, A., et al. Food applications of natural antimicrobial compounds. *Frontiers in Microbiology*, v. 3, artigo 287, 2012.
- MIN, B; AHN, D. U. Mechanism of Lipid Peroxidation in meat and meat products -A Review. *Food Science Biotechnology*, v. 14, p. 152-163, 2005.
- WARRISS, P. H.; WILKINS, L. J.; KNOWLES, T. G. The influence of ante mortem handling on poultry meat quality. In: RICHARDSON, R. I.; MEAD, G. C. *Poultry Science Symposium Series*. Oxon, U.K. CABI. Publishing. 1999. p. 217-230.

- CAPÍTULO 2 -

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1. Introdução

A avicultura brasileira vem ganhando lugar de destaque no mundo. Com isso, medidas relacionadas à segurança alimentar são cada vez mais exigidas, tornando-se um desafio contínuo para toda a cadeia produtiva que se inicia na fazenda e finaliza no prato do consumidor. Além do mais, por ser um alimento altamente perecível, a carne e os produtos à base de carne são comumente passíveis de contaminação por *Salmonella* spp., além de perdas na qualidade devido ao processo de oxidação lipídica.

Durante anos, a utilização de antibióticos e antioxidantes sintéticos como preventivos no controle destes problemas foi e continua sendo uma prática comum na indústria de alimentação humana e animal. Entretanto, as mudanças no contexto socioeconômico e cultural dos consumidores nos últimos anos refletiram em uma nova percepção dos alimentos; ou seja, uma demanda por produtos mais saudáveis e com menor risco ao comprador, sinalizando uma tendência da indústria à investigação e à utilização de produtos alternativos aos sintéticos.

Nesta linha, as plantas aromáticas e seus óleos essenciais com notáveis pluralidades de atividades (BURT, 2004) constituem uma possibilidade de escolha de uso para ação anti-*Salmonella* e antioxidante nas dietas dos animais e elaboração de produtos cárneos.

Entender os desafios da comercialização da carne de frango e propor medidas efetivas aliando o combate aos patógenos e o prolongamento da vida de prateleira, reforçado pelas expectativas de um consumidor atento e informado, consolidará ainda mais a avicultura no cenário nacional e internacional.

2. *Salmonella* spp.: uma preocupação global

Segundo os dados do World Health Organization (WHO, 2010), casos de salmonelose em humanos são uma preocupação de ordem global, por apresentarem uma significativa mortalidade, além de estarem presentes em todos os continentes. Esta disseminação é desigual entre as diferentes partes do mundo, sendo mais significativa nos países subdesenvolvidos. Ainda assim, na América do Norte este número é superior a um milhão de casos por ano e na América do Sul, o que inclui o Brasil, ultrapassa os oito milhões de casos.

De fato, a base de cálculo do Ministério da Saúde (BRASIL, 2014) demonstra que o agente causador do maior número de surtos alimentares entre os anos de 2000 e 2014 foi a *Salmonella* spp. (1564 surtos ou 38,2 %) ficando bem a frente do segundo colocado (*Staphylococcus aureus*; 798 surtos; 19,5 %). Dentre os surtos causados por alimentos contaminados, a carne de aves, incluindo processados e miúdos foi responsável pelo significativo número de 239 surtos alimentares durante estes anos. Apesar de ser uma estimativa bem abaixo dos números globais, estes dados são alarmantes e destacam a importância de estudos frente a microrganismos patogênicos, tais como a *Salmonella*, e frente ao alimento, como a carne de frango.

A *Salmonella* spp. é uma bactéria Gram-negativa que causa gastroenterite em humanos, sendo classificada como uma DTA (Doença Transmitida por Alimento). Nas aves, a *Salmonella* está normalmente presente no trato intestinal (CORRIER et al., 1999), sendo que os sorotipos que causam a salmonelose em humanos não mostram sintomas evidentes de infecções nestes animais (POPE; CHERRY, 2000).

Os sorotipos de *Salmonella* mais comuns que causam a DTA pertencem à subespécie *enterica* (*Salmonella enterica*), sendo que Enteritidis e Typhimurium são os principais sorovares isolados e estão entre as primeiras posições nos surtos alimentares nos Estados Unidos (USDA, 2012), países da União Européia (EFSA, 2014) e Brasil (BRASIL, 2014). Além do mais, a presença de *Salmonella* spp. nas aves se constitui em importante barreira ao comércio internacional de alimentos, se tornando um entrave para a expansão da avicultura.

São muitos os pontos críticos que favorecem a presença de *Salmonella* nas aves, como manejo sanitário e transporte dos animais, o cuidado nas etapas no frigorífico que, se não executados corretamente, favorecem a contaminação microbiana na carne (WARRIS et al., 1999; POPE; CHERRY, 2000; DELAZARI, 2001), além da comercialização no varejo e higiene no preparo dos pratos no dia a dia, demonstrando a necessidade de um controle em toda a cadeia produtiva.

Desde a descoberta da grande maioria dos antibióticos nas décadas de 1940 a 1960, estes são utilizados na produção animal tanto na forma profilática (promotor do crescimento animal) como terapêutica para o tratamento das enfermidades bacterianas (PENZ; KOLLER, 2007). De fato, o controle das doenças causadas por ingestão de carne e produtos cárneos contaminados será mais efetiva com a redução da prevalência de infecções na granja e nos

demais pontos passíveis de contaminação (HUMPHREY; JORGENSEN, 2006; VENKITANARAYANAN et al., 2013).

Entretanto, a história da utilização destas substâncias de forma indevida na medicina humana e na criação animal é objeto de grande preocupação a saúde, pelos riscos de resíduos de drogas nos produtos derivados dos animais e, particularmente, pela seleção de bactérias resistentes (ZHAO et al., 2006; CARLET et al., 2012; MATHER et al., 2013), fato este amplamente discutido pela sociedade acadêmica. A principal consequência é a emergência de patógenos multirresistentes, que transferidos para os seres humanos, podem causar infecções incuráveis (LEWIS, 2013).

São várias as causas para a seleção de bactérias resistentes que englobam desde o uso indiscriminado na criação animal e na medicina humana, a exposição destas bactérias a níveis sub-inibitórios de drogas, além do descarte indevido de substâncias pela indústria farmacêutica (ANDERSSON; HUGUES, 2014), sendo um obstáculo a ser tratado de forma global.

O aumento do número de bactérias resistentes a antibióticos, como *Salmonella* spp., é um fato bem comprovado pela pesquisa científica. Nos anos 60 já havia registros de cepas de *Salmonella* resistentes, relacionadas à criação de animais (MANTEN, 1963; ANDERSON, 1968). Mais recentemente, White et al. (2001) isolaram *Salmonella* em produtos cárneos e constataram que 84 % era resistente a pelo menos um antibiótico. Zhao et al. (2006) corroboraram com dados da mesma importância. No Brasil, Oliveira et al. (2005) isolaram 91 amostras de *S. Enteritidis* de produtos de aves e comprovaram que 90,1 % era resistente a um antibiótico e 51,6 % era multirresistente (resistente a dois ou mais agentes antimicrobianos). Duarte et al (2009) analisaram 260 carcaças, sendo que 25 (9,6 %) foram positivas para *Salmonella*, sendo o sorovar Enteritidis predominante. Com relação à suscetibilidade a agentes antimicrobianos, 94,7 % das cepas de *Salmonella* testadas, apresentaram resistência a um ou mais agentes antimicrobianos. Os perfís de resistência mais comumente observados entre os isolados foram a resistência à estreptomicina (73,7 %), nitrofurantoína (52,3 %), tetraciclina (31,6 %) e ácido nalidíxico (21 %).

Inserido neste contexto, o controle do uso de antibióticos e proibição de seu emprego como promotores de crescimento na ração animal é uma realidade na Europa, sendo que estas medidas vêm se estendendo ao redor do mundo. Ainda, a progressiva percepção negativa dos

consumidores ao uso de produtos artificiais na dieta dos animais tem impulsionado os estudos sobre aditivos alternativos para obtenção de alimentos mais seguros, e resultados satisfatórios na sanidade e produção animal (WALLACE et al., 2010).

3. Oxidação lipídica: um desafio na carne de frango

A deterioração da carne fresca de aves devido à oxidação lipídica é um encargo econômico para o produtor e que leva a necessidade do desenvolvimento de métodos para prolongar a vida útil com segurança e qualidade, que é o grande problema enfrentado pela indústria de processamento de aves.

A peroxidação lipídica é uma reação em cadeia de radicais livres sendo composta de três etapas principais: iniciação, propagação e terminação (MIN; AHN, 2005). Basicamente, a reação é iniciada pela captação de hidrogênio ou pela adição de um radical de oxigênio, que, uma vez ativado, pode reagir com o ácido graxo, resultando em seu dano oxidativo (SEVANI; HOCHSTEIN, 1985). Os ácidos graxos poli-insaturados são mais sensíveis do que os ácidos graxos saturados devido à presença de duplas ligações. Assim, a ligação metileno C-H se torna mais fraca e, portanto, o hidrogênio mais susceptível à captação (REPETTO et al., 2012).

Desta forma, a carne se torna passível à deterioração oxidativa devido às altas concentrações de lipídios não saturados, pigmentos heme, catalisadores metálicos e um conjunto de agentes oxidantes no tecido muscular (FALOWO et al., 2014). Com efeito, os lipídios, especialmente os fosfolipídios presentes nas membranas celulares são particularmente susceptíveis a danos oxidativos, estando positivamente correlacionados com o grau de insaturação dos seus ácidos graxos (FELLENBERG; SPEISKY, 2006).

Durante a oxidação e decomposição das moléculas de ácidos graxos, formam-se aldeídos de baixo peso molecular, como o malonaldeído, alcóois, cetonas, dentre outros, responsáveis pelas características de sabor e odor de gordura oxidada ou rancificada (MIN et al., 2008), sendo produtos indesejáveis do ponto de vista sensorial e definindo a vida útil do produto. Testes laboratoriais para avaliar o grau de oxidação lipídica dos produtos cárneos e assim determinar a sua vida de prateleira fornecem informações valiosas e essenciais a respeito do estado oxidativo e na predição da rancidez do alimento analisado. Revisão realizada por OSAWA et al. (2005) demonstrou que o método mais usual é a avaliação do TBA (ácido 2-tiobarbitúrico)

na carne armazenada, devido a sua simplicidade e rapidez. Este teste quantifica o malonaldeído gerado nos produtos para determinação do processo oxidativo.

O uso de antioxidantes, que são substâncias sintéticas ou naturais, é uma das maneiras para controlar a oxidação lipídica nos alimentos, pois apresentam a função de bloquear o efeito danoso dos radicais livres, prevenindo ou retardando o aparecimento do processo de rancificação. A valer, a definição da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) para antioxidantes é “a substância que retarda o aparecimento de alteração oxidativa nos alimentos” (ANVISA, 2017).

A habilidade dos antioxidantes em conter a sequência oxidativa é baseada principalmente na sua estrutura fenólica (OH), consistindo na remoção de iniciadores e propagadores de radicais livres. Na sua interação com os radicais, estes antioxidantes transferem um átomo de hidrogênio o que estabiliza a molécula, tornando-a de baixa reatividade e interrompendo a cadeia lipoperoxidativa (VALENZUELA et al., 2003; FELLEBERG; SPEISKY, 2006).

Os antioxidantes sintéticos com grupamento fenol como o BHT (Butil Hidroxitoluneno), BHA (Butil Hidroxanisol), TBHQ (terc-butil-hidroquinona) e PG (propilgalato) são utilizados pela indústria de ração animal há anos, a fim de evitar processos de oxidação que afetam a dieta causando alterações no sabor, aroma, cor, textura e valor nutritivo do alimento consumido (JENSEN et al., 1997). Além do mais, a manutenção do metabolismo animal e os efeitos deletérios que os radicais livres resultantes dos processos oxidativos exercem sobre a qualidade da carne, no pós-abate e durante o processamento e armazenamento, vem ganhando maior destaque (ZHANG et al., 2011). É notório que a carne sofra prejuízos decorrentes da ingestão de alimentos oxidados pelos animais, influenciado por vários fatores, como a fonte de óleo utilizada na dieta (JENSEN et al., 1997; CORTINA et al., 2005; RYMER; GIVENS, 2005), bem como o tipo e a quantidade de antioxidantes adicionados à dieta (LIN et al., 1989; BOU et al., 2006).

Também, as alterações fisiológicas relacionadas ao estresse, o período de jejum e tempo de transporte dos animais atuam significativamente na qualidade da carne. Estas práticas afetam diretamente as reservas de glicogênio no músculo, influenciando os níveis de pH e a capacidade de retenção de água; o que altera as características da carne como maciez, suculência

e cor (FLETCHER, 2002; FALOWO et al., 2014), atingindo diretamente a vida útil do produto e favorecendo as reações químicas, como a oxidação lipídica.

De acordo com GRAY et al. (1996), após a deterioração microbiana, a oxidação lipídica é a causa limitante da qualidade e aceitabilidade das carnes e produtos cárneos, podendo ainda ser exacerbada durante a etapa de armazenamento por fatores como temperatura, umidade, oxigênio e luz (CALLIGARIS et al., 2015). Já o processo de rancidez oxidativa ou peroxidação lipídica é acentuado durante o manuseio, processamento, armazenamento e cozimento dos produtos cárneos (MORRISSEY et al., 1998; MITSUMOTO et al., 2005; LIMA et al., 2013), sendo as mudanças na qualidade manifestadas por deterioração no sabor, cor, textura, valor nutritivo e ainda pela possibilidade de produção de compostos tóxicos (ROBEY; SHERMER, 1994; MATHIAS et al., 2010). Além disso, foi comprovado que a inclusão de cloreto de sódio utilizado de forma abundante nos produtos processados, tem ação pró-oxidante agindo como um catalizador das reações de oxidação (LEE et al., 1997; BRAGAGNOLO et al., 2005).

No caso do cozimento da carne, como ocorre com os produtos prontamente disponíveis para consumo, este provoca uma ruptura na estrutura do tecido muscular, causando a desnaturação de proteínas com consequente perda na atividade enzimática, além de liberar ferro que atua como catalisador da oxidação (MIN; AHN, 2005), o que aumenta a geração de radicais livres e diminui os sistemas de proteção antioxidante na carne (SOLADOYE et al., 2015).

Rhee et al. (1996) afirmaram que o potencial oxidativo dos tecidos musculares é diferente para as diferentes espécies, sendo a carne de frango bastante susceptível, especialmente após o cozimento. Por ser uma carne rica em ácidos graxos poli-insaturados comparada aos outros tipos de carne, exceto peixes (BRAGAGNOLO, 2001; NUNES et al., 2003, HAUTRIVE et al., 2012), este processo é ainda mais agravado. Isto se aplica principalmente à carne escura (coxa e sobrecoxa), por apresentarem maiores concentrações destes ácidos graxos em relação à carne branca (peito) (JENSEN, et al., 1997). A presença de oxigênio e dos radicais livres formados durante as reações subsequentes pode levar não apenas ao processo de rancificação, mas também às perdas de vitaminas lipossolúveis e alterações de cor e degradação protéica, sendo fator determinante na vida útil dos produtos cárneos (LADIKOS; LOUGOVOIS, 1990; WOODS; CHURCH, 1999, XIAO et al., 2011).

Mesmo os antioxidantes sintéticos que permitem um controle dos processos oxidativos nos músculos dos animais, como relatado por vários autores (LIN et al., 1989;

KORELESKI; SWIATKIEWICZ, 2007, SMET et al., 2008; LUNA et al., 2010), apresentam utilização questionável em um cenário onde grande parte dos consumidores rejeitam o uso de aditivos artificiais nas dietas dos animais e na fabricação de produtos derivados dos animais. Revisão apresentada por Carochi; Ferreira (2013) enfoca sobre a utilização e efeitos da incorporação de antioxidantes sintéticos nos alimentos. Segundo os autores, estes compostos são adicionados aos alimentos para dar resistência aos vários tratamentos e condições adversas de temperatura, bem como para prolongar a sua vida útil. Os antioxidantes sintéticos mais importantes e amplamente disponíveis como BHA, BHT, PG (propil galato) e ácido ascórbico são utilizados principalmente para a prevenção da oxidação dos alimentos, especialmente dos ácidos graxos. Hoje, quase todos os alimentos processados têm antioxidantes sintéticos incorporados, sendo relatados como seguros.

A EFSA (European Food Safety Authority) revisou recentemente e estabeleceu as doses diárias admissíveis de 0,25 mg/kg de peso corporal/dia para BHT e 1,0 mg/kg de peso corporal/dia para BHA, constatando que a exposição a adultos e crianças seria pouco provável de exceder estas ingestões (EFSA, 2011; EFSA, 2012). No Brasil, a incorporação de aditivos com função antioxidante é regulamentada pela legislação (Brasil, 1998) que não autoriza o uso de antioxidantes em carnes frescas e congeladas *in natura*, mas permite a adição, por exemplo, de BHA e BHT em alguns produtos cárneos industrializados, em quantidade de 0,01 g de antioxidante/100g de produto.

Embora estudos tenham mostrado os efeitos benéficos do uso de antioxidantes, outros certificam o contrário, havendo a suspeita de apresentarem riscos potenciais à saúde humana, como efeitos carcinogênicos (CHEN et al., 1992; KAHL; KAPPUS, 1993). Em meio a controvérsias, estes antioxidantes sintéticos têm sido restringidos em alguns países. A própria IARC (International Agency for Research on Cancer) classifica o BHA como nível 2B que significa “possivelmente cancerígeno para humanos” (IARC, 2012).

Estes fatos têm orientado as pesquisas na busca de alternativas a estes produtos, sendo uma preferência os antioxidantes naturais, como os tocoferóis (vitamina E), e aqueles derivados de plantas aromáticas, como os óleos voláteis ou nomeados como essenciais.

Os óleos essenciais presentes nas espécies aromáticas com conhecidas ações medicinais (BUCKLE, 2015) se apresentam como uma opção viável para ser incluída tanto na dieta dos animais como nos produtos derivados dos animais para consumo humano. Estas

substâncias são ricas em compostos fenólicos, podendo melhorar a qualidade geral da carne através da diminuição da oxidação de lipídios e o crescimento microbiano (RADHA KRISHNAN et al., 2014), sendo que a grande maioria dos óleos voláteis apresentam mais de uma atividade comprovada. Assim, em sistemas alimentares, estas substâncias podem realçar o sabor, retardar a deterioração dos alimentos induzida pela oxidação lipídica, inibir o crescimento de microrganismos e ainda desempenhar papéis na diminuição do risco de algumas doenças (HYLDGAARD et al, 2012)

Deste modo, com o crescente interesse em produtos que não sejam sintéticos para aplicações alimentares, os antioxidantes naturais vêm constituindo uma tendência progressiva na preferência dos consumidores.

4. Os óleos essenciais

Os óleos essenciais obtidos de plantas medicinais e aromáticas são utilizados há muito tempo como aromas ou fragrâncias, além de seu uso na medicina alternativa ser milenar. Atualmente um interesse crescente tem sido demonstrado pela indústria de produção animal para a substituição de produtos sintéticos por naturais, como é o caso da utilização de plantas ricas em compostos bioativos e óleos essenciais, conhecidos por suas propriedades antimicrobianas, antifúngicas, antioxidantes, dentre outras (BURT, 2004; BOU et al., 2009).

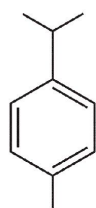
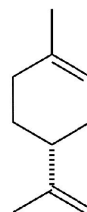
Óleos essenciais consistem em uma mistura de compostos voláteis, complexos, caracterizados por um forte odor e formados como metabólitos secundários por plantas medicinais e aromáticas, em resposta ao estresse e ao ataque de patógenos e predadores. O termo metabólito secundário significa que não são essenciais para as funções básicas da planta, apesar de desempenharem importante papel de proteção como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, entre outros, sendo fundamentais para a perpetuação da espécie (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008; BASER; BUCHBAUER, 2015).

As substâncias encontradas nos óleos essenciais apresentam uma grande variedade de classes químicas, sendo que os principais grupos são compostos voláteis incluindo terpenos e terpenóides e outros constituintes aromáticos e alifáticos como os fenilpropanos; todos caracterizados pelo baixo peso molecular (BAKKALI et al., 2008; SMITH – PALMER, et al., 2001). Os terpenos são hidrocarbonos classificados de acordo com a sua unidade estrutural básica

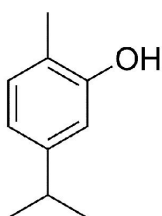
de isopreno, formada por cinco carbonos (C_5) (HYLDGAARD et al., 2012). Dependendo do número de isoprenos, os compostos terpenos podem ser subdivididos em mono-, sesqui e di-terpenos com, respectivamente, 2, 3 e 4 unidade de isopreno (LEE et al., 2004). Os monoterpenos (C_{10}) e sesquiterpenos (C_{15}) representam a maioria dos óleos essenciais, permitindo uma grande variedade de estruturas (BAKKALI et al., 2008). O terpeno contendo oxigênio (O) é denominado de terpenóide, como por exemplo o *p*-cimeno, que é um monoterpeno precursor do carvacrol e apresenta a fórmula $C_{10}H_{14}$, sendo o carvacrol um monoterpenóide, apresentando o O na sua estrutura química ($C_{10}H_{14}O$) (Figura 1). São exemplos de terpenóides, além do carvacrol, o timol, linalol, mentol e geraniol, dentre outros (HYLDGAARD et al., 2012).

Os compostos aromáticos detectados nos óleos essenciais são derivados do fenilpropano e ocorrem em menor frequência do que os terpenos (BAKKALI et al., 2008), mas, não sempre em menores proporções na planta, como é o caso do eugenol que está presente entre 70 e 90 % no óleo essencial de cravo (GANG et al., 2001). O grupo dos fenilpropanóides possui um esqueleto carbônico com um anel aromático (grupo fenila) ligado a uma cadeia de três carbonos (Figura 1) (BAKKALI et al., 2008, HYLDGAARD et al., 2012). Eugenol, um composto aromático fenol e, cinamaldeído, um composto aromático aldeído, são grupos estudados largamente em função da diversidade de suas características biológicas (LEE et al., 2004; BAKKALI et al., 2008).

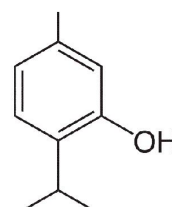
De modo geral, os óleos essenciais estão presentes na grande maioria das plantas, mas em quantidades variadas, sendo que algumas famílias botânicas acumulam mais do que outras, além do perfil de compostos e localização dos aparelhos secretores serem característicos de cada espécie (CAPASSO et al., 2003). Por exemplo, as plantas aromáticas pertencentes à Família Lamiaceae acumulam preferencialmente monoterpenos e sesquiterpenos em seus óleos voláteis. Entretanto, alguns gêneros produzem óleos ricos em fenilpropano, como ocorre nas espécies de *Ocimum* (FRANZ – NOVAK, 2015).

Monoterpenos*p*- cimeno

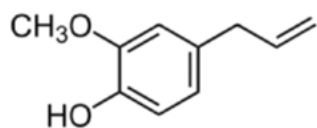
limoneno

Monoterpenóides

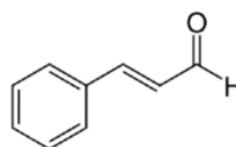
carvacrol



timol

Fenilpropanóides

eugenol



cinamaldeído

Figura 1: Estruturas químicas de alguns compostos presentes nos óleos essenciais. Adaptado de Hydgaard et al. (2012).

Desta forma, devido à grande variedade na composição dos óleos essenciais, uma vez que podem conter de 20-60 compostos orgânicos ou mais, presentes nas mais diferentes concentrações (BAKKALI et al., 2008), estes apresentam uma amplitude de aplicações, sendo fundamental a sua caracterização para indicação de sua atividade biológica (TUREK; STINTZING, 2013). Geralmente, a maioria dos óleos essenciais contêm dois ou três compostos majoritários, podendo constituir até 90 % do seu perfil bioquímico, tornando-se estes determinantes para as propriedades ativas dos óleos essenciais, embora muitas vezes seja demonstrado um sinergismo entre os diferentes constituintes, majoritários ou não (BAKKALI et al., 2008).

Para que os óleos essenciais sejam explorados, estes devem ser extraídos e por serem estruturas voláteis são facilmente obtidas através de diferentes métodos, como a hidrodestilação, extração por solvente, por microondas, dentre outros (SANTOS et al., 2004). De acordo com Turek; Stintzing (2013), a maioria dos óleos essenciais presentes no mercado é extraída por hidrodestilação, devido ao baixo custo e boa eficiência de obtenção através deste método. Também, os óleos essenciais apresentam uma baixa solubilidade em água, mas são solúveis em gorduras, álcool, solventes orgânicos e outras substâncias hidrofóbicas, e são geralmente líquidos à temperatura ambiente (CARSON; HAMMER, 2011). Assim, estas características de volatilidade e solubilidade em solventes orgânicos permitem caracterizá-los e promover o isolamento de seus constituintes, os quais são responsáveis por suas propriedades físico-químicas e biológicas (HYLDGAARD et al., 2012).

Entretanto, é importante compreender que são diversos os elementos que exercem influência na composição dos óleos essenciais, como a estação do ano em que as plantas são cultivadas (CELIK TAS et al., 2007; HUSSAIN et al., 2008), época e horário de colheita, idade da planta (HUDAIB et al., 2002), radiação solar (CHANGA et al., 2008), dentre outros, como fatores geográficos e quimiotipos (VIEIRA et al., 2002). Além destes fatores externos, as diferentes técnicas de extração têm demonstrado significativo impacto nas concentrações relativas dos constituintes dos óleos essenciais (WANG; WELLER, 2006), em que o processamento inadequado das plantas pode ocasionar degradação dos seus constituintes, implicando na perda da atividade farmacológica (SERVAT et al., 2010). Consequentemente, estas flutuações na composição dos óleos essenciais devido às variadas condições devem ser consideradas para avaliação de sua qualidade e utilização.

Dentre os fitoconstituintes dos óleos essenciais, aqueles derivados de fenol, tais como timol, carvacrol e eugenol são conhecidos como potentes agentes antimicrobianos e antioxidantes (DORMAN et al., 2000; HOFFMAN-PENNESI.; WU, 2010). Existe uma correlação linear entre a alta porcentagem de compostos fenólicos da planta e uma forte propriedade antibacteriana (FARAG et al., 1989; DORMAN; DEAN, 2000; LAMBERT et al., 2001; RHAYOUR et al., 2003), além de alta capacidade antioxidante (ZHENG; WANG, 2001; KATSUBE et al., 2004; SHAN et al., 2005; DUDONNÉ et al., 2009), comprovadas por estudos *in vitro*.

O óleo essencial de tomilho obtido da espécie *Thymus vulgaris* é reconhecido pelas altas concentrações de timol (2 – isopropil – 5 – metilfenol) e carvacrol (4 – isopropil – 2 –

metilfenol) em sua composição química (CONSENTINO et al., 1999; LEE et al., 2005; WEI; SHIBAMOTO, 2010, ROMANE et al., 2012) e o óleo essencial de alfavacão, extraído do *Ocimum gratissimum*, apresenta um alto valor de eugenol (4 – alil - 2-metoxifenol) (SIMON et al, 1999; VASCONCELOS SILVA et al., 1999; VIEIRA et al., 2001; FREIRE et al., 2006). Ambos pertencem à família Lamiaceae, compreendida pela riqueza de espécies com propriedades diversificadas e com longa história de usos como especiarias culinárias e na medicina popular (PADEY et al., 2014).

O Brasil apresenta uma das maiores diversidades botânicas do mundo, havendo ainda um enorme potencial a ser explorado quanto ao uso de seus óleos essenciais para numerosas finalidades. Desta forma, apesar dos estudos comprovando suas atividades e sugerindo o emprego de óleos essenciais em diferentes segmentos, pesquisas complementares se fazem necessários para dar sustentabilidade ao seu emprego industrialmente, como na indústria alimentícia, tanto para um maior entendimento da ação antimicrobiana, como no combate à *Salmonella*, quanto na ação antioxidante, averiguando os efeitos sobre a estabilidade oxidativa da carne. Além do mais, a prática da microencapsulação, que preserva de forma mais eficiente os compostos voláteis dos óleos essenciais e facilita seu manuseio, é pouco explorada. Sendo assim, o desenvolvimento de um produto natural à base de óleos essenciais microencapsulados, para ser adicionado nas dietas das aves com atuação contra *Salmonella* Enteritidis e preservando as características da carne para prolongar sua vida útil se torna desejável.

5. Microencapsulação de óleos essenciais

Como definido anteriormente, os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, podendo, na sua maioria, se dissipar com grande facilidade. Esta perda dos compostos voláteis como o timol, carvacrol e eugenol, significaria uma perda das funções ativas dos óleos essenciais os quais fazem parte. Além do mais, estes compostos são susceptíveis a oxidação, podendo se tornar instáveis na presença de calor, luz, oxigênio, dentre outros fatores (TUREK; STINTZING, 2013; DE BARROS FERNANDES et al., 2014). Ainda, a própria natureza característica dos óleos essenciais e seus componentes poderiam prejudicar o seu uso. Por exemplo, devido a sua condição lipofílica e capacidade de penetrar na pele, os óleos essenciais podem causar dermatites alérgicas com o contato frequente (BURT, 2002; GALBIATI

et al., 2011); interagir com o alimento ou seus nutrientes, o que prejudicaria a sua atividade (SMITH - PALMER et al., 2001; SI et al., 2006), além de poder afetar os aspectos sensoriais e aceitabilidade dos produtos a que são adicionados (BUSATTA et al., 2008). Sendo assim, desenvolver tecnologias que preserve a composição química dos óleos essenciais, sua vida útil e ainda amenizar os efeitos negativos que podem causar seria vantajoso para o uso na nutrição animal e nas formulações alimentícias.

A técnica da microencapsulação com o uso de *spray-drying* é utilizada há décadas para preservar as características funcionais de substâncias como *flavors*, lipídios, carotenoides, dentre outras (GHARSALLAOUI et al., 2007), podendo ser uma alternativa promissora para preservação de produtos naturais, como os óleos essenciais (SERVAT et al., 2010). Neste processo, o produto líquido é atomizado por uma corrente de ar quente e, por causa da grande área de superfície criada pela atomização, a evaporação da água é muito rápida, (BERGQUIST, 1982; GHARSALLAOUI et al., 2007) o que evita danos sensíveis nas propriedades essenciais do produto desidratado (AGUIRRE, 1979). O resultado é um pó com facilidade de manuseio e estoque e também de proteção do material ativo contra reações indesejáveis, uma vez que existe uma barreira física para proteger seu conteúdo (GHARSALLAOUI et al., 2007; CARNEIRO et al., 2013). O método ainda apresenta vantagens como rapidez, custo relativamente baixo e facilidade de obtenção do equipamento, sendo uma técnica altamente reproduzível e adequada para aplicações industriais (BURGAIN et al., 2011).

O material resultante do processo por *spray-drying* depende das propriedades físico-químicas da substância que será atomizada e da composição do material de parede, sendo este determinante para manter a integridade e funcionalidade dos componentes bioativos (KRISHNAN et al., 2005; JAFARI et al., 2008; CARNEIRO et al., 2013). Desta forma, a escolha do material de parede, ou material encapsulante é primordial, uma vez que irá influenciar as propriedades da emulsão antes da secagem, a retenção dos voláteis durante o processo e a duração de conservação do pó encapsulado após a secagem (JAFARI et al., 2008). Muitas substâncias apresentam boas propriedades para serem utilizadas como material de parede, como gomas naturais (goma arábica, alginatos, entre outras), proteínas (leite ou soro de leite, gelatina, entre outras), maltodextrina com diferentes dextroses equivalentes e blendas destes produtos (GHARSALLAOUI et al., 2007, JAFARI et al., 2008, WANG et al., 2009; CARNEIRO et al., 2013; DE BARROS FERNANDES et al., 2014). Entretanto, os polímeros encapsulantes mais

utilizados na técnica do *spray-drying* são a goma arábica e o amido, pelo fato que tendem a formar micropartículas esféricas durante o processo de secagem (DE VOS et al., 2010), embora as condições de operação do equipamento possam influenciar no tamanho das partículas (ALVARENGA BOTREL et al., 2012) e na sua morfologia (WALTON; MUMFORD, 1999).

A maltodextrina é um amido hidrolisado e de fato comumente utilizado como material de parede na microencapsulação de ingredientes alimentares, pois apresenta vantagens tais como o custo relativamente baixo, o aroma e o gosto neutros, a alta solubilidade em água e baixa viscosidade (AVALTRONI et al., 2004; GHARSALLAOUI et al., 2007), além de provocar a diminuição da atividade de água e higroscopicidade do produto encapsulado (NUNES et al., 2015).

Contudo, é importante salientar que para substâncias contendo componentes voláteis, como é o caso dos óleos essenciais, a temperatura é um dos fatores mais importantes durante o processamento, além do armazenamento (KRISHNAIAH et al., 2012), sendo necessário um material de parede que preserve as características do produto final.

Robert et al. (2010) demonstraram que a encapsulação com maltodextrina de compostos ativos como polifenóis e antocianinas do suco de romã foi eficiente em preservar seus níveis durante o estoque, sendo superior ao isolado proteico de soja. De Barros Fernandes et al. (2014) afirmaram ser uma alternativa interessante a encapsulação de óleo essencial de alecrim utilizando uma mistura de amido modificado e maltodextrina, por ser um material de parede relativamente barato com boas propriedades, incluindo a alta retenção de voláteis. A mistura de maltodextrina e concentrado proteico de soja encapsulada demonstrou uma grande proteção dos ativos do óleo de linhaça contra a oxidação lipídica durante o período de quatro semanas de estoque, apesar de promover uma baixa eficiência de encapsulação (CARNEIRO et al., 2013). Também Pang et al. (2014) sugeriram que a microencapsulação utilizando maltodextrina preservou de maneira mais eficiente os polifenóis durante o processo do *spray drying*, em comparação ao isolado proteico de soja. Para Nunes et al. (2015) a microencapsulação do extrato das folhas de erva mate crio concentrado, utilizando maltodextrina, preservou os compostos fenólicos durante o processo de *spray drying* e, além disso, aumentou sua estabilidade durante o armazenamento sob a refrigeração.

De acordo com Rodrigues (2004), a utilização da maltodextrina como material de parede no processo por *spray drying*, se torna viável para estudos de microencapsulação de óleos essenciais e sua adição nas dietas animais e nas formulações de produtos cárneos.

6. *T. vulgaris* e *O. gratissimum* e suas propriedades anti-*Salmonella*

As espécies aromáticas utilizadas na culinária, como orégano (composto majoritário carvacrol) e tomilho (composto majoritário timol) se mostraram efetivas em inibir *S. Enteritidis* nos estudos *in vitro* de Chorianopoulos et al. (2004); Peñalver et al. (2005); Santurio et al. (2007), Miladinović et al. (2012) e Thanissery et al. (2014). Pesquisas realizadas na Divisão de Microbiologia do CPQBA/UNICAMP comprovaram a ação do óleo essencial destas especiarias para *S. Choleraesuis* a uma concentração mínima inibitória (minimum inhibitory Concentration - MIC) de 600 ppm para ambas (SARTORATTO et al., 2004).

Os estudos com os compostos majoritários das plantas aromáticas como o timol, carvacrol e eugenol são mais frequentes, demonstrando uma diversidade de combinações que podem originar no sinergismo entre as moléculas. Vardar-Ünlü et al. (2003) avaliaram o óleo essencial de *T. pectinatus* e seus componentes separadamente, como o timol, carvacrol, *p*-cimeno e borneol e atribuíram a atividade antimicrobiana ao timol seguido pelo carvacrol e, também, um efeito sinérgico entre os demais. Hoffman-Pennesi; Wu (2010) determinaram a MIC do timol e do óleo de tomilho como sendo de 400 e 1540 ppm para *S. Typhimurium*, indicando que o efeito anti-*Salmonella* foi devido ao timol. Helander et al. (1998) determinaram a MIC de 150 ppm para ambas moléculas, de carvacrol e timol contra *S. Typhimurium*. Logo, Consentino et al. (1999) determinaram que a molécula de timol controlou melhor o crescimento desta bactéria (56 ppm) do que a molécula de carvacrol (225 ppm). Também Zhou et al. (2007) avaliaram a ação antimicrobiana das moléculas de timol e carvacrol isoladas e combinadas na proporção 1:1 contra *S. Typhimurium* e notaram um efeito sinérgico entre estas moléculas, sendo que cada uma isolada apresentou uma MIC de 400 ppm e, quando combinadas, a MIC foi de 100 ppm. Recentemente, Calo et al. (2015) constataram que as moléculas de carvacrol e *trans*-cinamaldeído inibiram completamente o crescimento de cepas de *S. Heidelberg*, nas concentrações de 122 e 131 ppm, respectivamente.

A atividade antibacteriana do eugenol, cinamaldeído, timol, carvacrol e suas combinações foram investigados contra a bactéria *Escherichia coli*. O eugenol apresentou a menor atividade antibacteriana (valor MIC: 1600 ppm) em comparação com os outros três compostos que tinham um valor de MIC de 400 ppm. No entanto, quando o eugenol foi combinado com cinamaldeído, timol ou carvacrol, foram observadas interações sinérgicas resultando em valores de MIC de 400, 100, 100 ppm, respectivamente (PEI et al., 2009). Ainda, Kollanoor Johny et al. (2010 a) concluíram que compostos puros de timol e eugenol foram eficientes em eliminar a *S. Enteritidis* em conteúdo cecal de frango, quando avaliado *in vitro*.

O composto eugenol é tradicionalmente conhecido como sendo o constituinte de maior proporção no óleo essencial do cravo (*Eugenia caryophyllata*). Entretanto, a espécie *O. gratissimum* L., popularmente conhecida como alfavacão, tem também o eugenol como principal composto identificado em sua composição (VASCONCELOS SILVA et al., 1999; VIEIRA et al., 2001). Revisão apresentada por PRABHU et al. (2009) destaca várias propriedades reconhecidas e estudadas do *O. gratissimum*, ressaltando o eugenol como o componente majoritário em diferentes partes da planta, dando ênfase à sua atividade antimicrobiana e alta capacidade antioxidante, quando avaliado *in vitro*.

Além das pesquisas que demonstram a ação antimicrobiana dos óleos essenciais, outras áreas vêm sendo exploradas com o objetivo de maximizar a ação destas moléculas sobre a sensibilidade de cepas resistentes, e seus efeitos na virulência destas cepas (LANGEVELD, et al., 2014; UPADHYAY et al., 2014). Kollanoor Johny et al. (2010 b) comprovaram que a combinação de timol e eugenol com diferentes tipos de antibióticos (ampicilina, cloranfenicol, estreptomicina, sulfametoxazol e tetraciclina) podem modular a sensibilidade da *S. Typhimurium* às drogas, o que indica que o uso de moléculas naturais juntamente com antibióticos diminui a virulência e a resistência do patógeno ao antibiótico.

Diferente da quantidade e consistência de conteúdo das pesquisas realizadas *in vitro* é importante considerar que o estudo destes óleos em sistemas biológicos vivos com o objetivo de avaliar seus mecanismos de ação é altamente complexo e depende da composição completa dos óleos, dos efeitos isolados, sinérgicos, aditivos e/ou antagônicos de seus constituintes, ou quando utilizados na forma de blendas (WOJDYLO et al., 2007; WEI; SHIBAMOTO, 2010; SEOW, et al., 2014).

Os próprios mecanismos de ação dos diversos componentes que compõe cada óleo essencial ainda não foram completamente elucidados; justamente pela complexidade que se apresentam devido à interação entre as moléculas, podendo ainda agir de forma diferente entre os patógenos (BURT, 2004). O que mais se tem documentado é que a característica hidrofóbica e a presença do grupo hidroxila livre nos compostos fenólicos como o timol, carvacrol e também o eugenol, permite a ligação do hidrogênio o que afeta o pH e o equilíbrio iônico danificando e/ou modificando a membrana celular da bactéria, prejudicando a permeabilidade e resultando na apoptose (HELANDER et al., 1998; LAMBERT et al., 2001; BEM ARFA et al., 2006; Di PASQUA et al., 2006; DEVI et al., 2010). Recentemente, Chauhan; Kang, (2014) comprovaram que a ruptura da integridade da membrana lipídica, observada pela maior concentração extracelular de íons de potássio, é o principal mecanismo de ação do timol contra *S. Typhimurium*, Além do mais, a eficiência do timol em atuar na morte intracelular deste patógeno, na qual outras drogas não conseguiram, combinada com a sua capacidade de promover a recuperação de macrófagos no estresse oxidativo, torna este composto uma boa opção para o tratamento de infecção por *Salmonella*.

A fim de comprovar a aplicabilidade destas substâncias, os experimentos realizados *in vivo* se tornam essenciais para elucidar e confirmar a eficácia na utilização dos óleos essenciais, expressando seus resultados na forma de melhoria de desempenho, controle de patógenos e prolongamento de vida de prateleira, que são os objetivos da atividade antimicrobiana e antioxidante destes compostos.

Experimentos com a planta de tomilho ou partes não indicam efeito negativo sobre as variáveis de desempenho quando oferecida para frango de corte. Toghyani et al. (2010) avaliaram o efeito promotor de crescimento do pó de tomilho em comparação ao antibiótico e comprovaram que a suplementação das dietas de frangos de corte com 5 g/kg de tomilho pôde influenciar de forma positiva o desempenho sem quaisquer impactos prejudiciais nas respostas imunes e nas variáveis sanguíneas. Concordando, Ocak et al. (2008) ofereceram folhas de tomilho (0,2 %, p:p) para frangos de corte, o que não afetou o desempenho e as características de carcaça. Abdel-Wareth et al. (2010) concluíram que ervas de tomilho e orégano suplementado em 15 ou 20 g/kg de dieta podem ser utilizados como aditivos alimentares eficazes para melhorar o desempenho de frangos de corte. No experimento de Alipour et al. (2015) a inclusão de 100 ppm de extrato de tomilho na dieta melhorou a resposta imunológica dos frangos.

Na avaliação com o óleo essencial do tomilho, o qual apresenta um odor e sabor mais impactante do que o extrato da planta, Najafi; Torki (2010) suplementaram as dietas de frangos de corte com 200 ppm de óleo de tomilho em um tratamento, e óleo de cravo (200 ppm) em outro tratamento. Foram constatadas pelos autores que estes óleos não afetaram o desempenho das aves de 1 a 21 dias de idade e também as características de carcaça em relação ao grupo controle. Hoffman-Pennesi; Wu (2010) avaliaram a adição de 0,2, 0,4 e 0,8 g/kg de timol e 2 e 4 mL/kg de óleo de tomilho e não encontraram diferença no desempenho durante 16 e 28 dias de avaliação. Tiihonen et al. (2010) avaliaram uma blenda contemplando 15 g/T de timol e 5 g/T de cinamaldeído, a qual melhorou o ganho de peso dos frangos no período de 42 dias, além de exercer um efeito positivo na microbiota intestinal (efeito modulador). A inclusão de 0,75 % de trans-cinamaldeído ou 1 % de eugenol nas dietas de frangos de corte não prejudicaram o peso corporal e o consumo de ração (KOLLANOOR-JOHNLY et al., 2012 a).

Ensaio de desafio, em que as aves são inoculadas com quantidades conhecidas do patógeno para avaliação da colonização de ceco e eliminação pelas excretas se tornam ferramentas valiosas para mensurar a ação dos óleos voláteis. Experimentos atuais nesta condição, utilizando frangos de corte, demonstraram resultados positivos na redução de *Salmonellas* com a utilização das moléculas dos óleos essenciais.

O trans-cinamaldeído nas concentrações de 0,5 e 0,75 % e o eugenol nas concentrações de 0,75 e 1,0 % foram efetivos na diminuição da colonização de *S. enteritidis* nas amostras de ceco de frangos de corte, quando avaliados em uma série de experimentos (KOLLANOOR-JOHNLY et al., 2012 a; b). Também, uma blenda de óleos essenciais à base de cinamaldeído e timol suplementado (100 mg/kg) nas dietas para frangos de corte durante um período de 42 dias restringiu significativamente a transmissão horizontal e a prevalência de *S. Heidelberg* nas aves tratadas em comparação àquelas do controle (AMERAH et al., 2012). Fato este também observado por Cerisuelo et al. (2014), quando avaliaram a combinação de uma dose baixa desta mesma blenda (50 mg / kg) com 1 g/kg de Na-butilato, e constataram a diminuição da prevalência de *S. Enteritidis* no ceco das aves. A mistura de 0,05 % de óleos essenciais compostos por carvacrol, timol, eucaliptol e limão controlou de forma significativa a colonização de *S. Heidelberg* no papo, além de melhorar a conversão alimentar e aumentar o ganho de peso das aves que receberam a suplementação na água de bebida, em relação ao grupo controle (ALALI et al., 2013). Hoffman-Pennesi; Wu (2010) inocularam aves com *Salmonella* nos primeiros dias de

vida e avaliaram a ação da molécula de timol em vários níveis (0,2 0,4 e 0,8 g / kg). No entanto, os autores obtiveram resultados inconclusivos sobre o controle do patógeno.

Desafiando as aves com *Salmonella*, Amerah et al. (2012) não observaram nenhum efeito em qualquer uma das variáveis de desempenho medidos. Apesar de ser recorrente e sabido que a colonização por *Salmonella* no frango de corte não impacta de forma significativa o desempenho, perdas ocorrem como demonstrado por Remus et al. (2014), em que aplicando uma meta-análise constataram perdas de 9 % no consumo diário de ração e de 29 % no ganho de peso diário nos lotes desafiados por *Salmonellas*.

7. *T. vulgaris* e *O. gratissimum* e suas propriedades antioxidantes

Os extratos herbais e seus constituintes voláteis, os óleos essenciais, conquistam cada vez mais um papel de destaque na investigação do seu uso no controle da oxidação lipídica para ser incorporado tanto na dieta dos animais como na formulação de produtos derivados para consumo humano. Dentre as especiarias estudadas com esta finalidade, aquelas pertencentes à Família Lamiacea e seus respectivos compostos majoritários como o orégano (carvacrol) e tomilho (timol) apresentam resultados relevantes quanto a capacidade antioxidante (YANISHLIEVA et al., 2006), sendo ainda o *T. vulgaris* (tomilho) usado como referência de padrão antioxidante (Sacchetti et al., 2005). Também o alfavacão (nome conhecido no Brasil para a espécie aromática *O. gratissimum*) cuja constituição química é predominantemente composta pelo eugenol, apresenta uma alta eficácia antioxidante (AKINMOLADUN et al., 2007; AWAH; VERLA, 2012) embora as pesquisas sejam menos frequentes.

Assim, é cada vez mais evidente que os antioxidantes naturais, que têm basicamente uma estrutura fenólica, desempenham um papel importante na proteção dos tecidos contra os danos dos radicais livres (NAGABABU et al., 2010). Os constituintes fenólicos de muitos destes óleos funcionam como captadores de radicais livres e doadores de hidrogênio impedindo a oxidação de lipídios (JAYASENA; JO, 2014). O timol, carvacrol e eugenol são destes compostos fenólicos naturais mais ativos dentre os óleos essenciais (YANISHLIEVA et al., 1999) dispondo de características antioxidantes que têm sido comprovadas em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

O efeito antioxidante do tomilho foi associado ao alto teor de carvacrol e timol (NGUYEN et al., 2000; LEE et al., 2005). Wei; Shibamoto (2010) avaliaram a ação antioxidante

de 25 tipos de óleos essenciais em quatro diferentes metodologias *in vitro* e concluíram que o de tomilho foi o que apresentou a melhor atividade antioxidante em três destas metodologias. Os autores concluíram que óleos de folha de tomilho e também de cravo continham altos níveis de timol (23 %) e eugenol (77 %), respectivamente, como principal responsável pela atividade antioxidante. Trabalhos conduzidos por Kahkonen et al. (1999), Lee et al. (2005), Wojdylo et al. (2007) e Roby et al. (2013) indicaram que o óleo volátil do tomilho se apresentou como potente antioxidante, comparável ao BHT e ao alfa-tocoferol.

Também quando Dorman et al. (2000) avaliaram a capacidade antioxidante *in vitro* de vários óleos essenciais e seus compostos, os autores concluíram uma atividade alta e equivalente atribuída ao eugenol e timol, seguido pelo carvacrol, sendo os principais constituintes presentes nos óleos essenciais de cravo, tomilho e orégano, respectivamente. Neste trabalho foi demonstrada e comprovada a importância do grupo hidroxil nos fenólicos timol, carvacrol e eugenol, além de sugerirem que a mudança na posição do grupo hidroxil influencia a eficácia e ação da molécula (timol e carvacrol). Este fato foi comprovado por Yanishlieva et al. (1999), que demonstraram que ambos os antioxidantes atuam de forma diferente e dependente do carácter do meio lipídico. Dentre os 33 fitoconstituintes avaliados, apenas o eugenol e timol apresentaram capacidade antioxidante similar ao antioxidante sintético BHA, que foi superior ao BHT, propilgalato e alfa-tocoferol (DORMAN et al., 2000). Entretanto, Nagababu et al. (2010) evidenciaram que a atividade inibitória do eugenol foi cinco vezes maior do que a do alfa-tocoferol, mas 10 vezes menor que a do BHT. Neste trabalho foi avaliada a atividade antioxidante do eugenol em ensaios *in vitro* e *in vivo*, sendo que *in vitro* a peroxidação lipídica foi induzida nas mitocôndrias pelo ferro e pela composição ferro e peróxido de hidrogênio (reação de Fenton), em que o composto eugenol inibiu ambas, concluindo-se que este foi incorporado na membrana mitocondrial, impedindo a peroxidação lipídica e operando como agente de quebra da cadeia. Este resultado já havia sido relatado pelo mesmo grupo de pesquisadores, no qual os estudos sobre a formação de TBARS indicaram a capacidade do eugenol para inibir reações de iniciação e propagação, atuando na peroxidação lipídica como um antioxidante de quebra de cadeia pela doação da hidroxila (NAGABABU; LAKSHMAIAH, 1992; 1994). Naidu (1995) confirmou esta ação propondo a capacidade de eliminação do radical hidroxila do eugenol na inibição da propagação da peroxidação lipídica, sendo esta a forma de atuação dos compostos fenólicos.

Entretanto, é importante considerar as ponderações de Dawidowicz; Olszowy (2014), que propuseram que as propriedades antioxidantes do óleo essencial nem sempre dependem da atividade antioxidante do seu componente principal, e que podem ser moduladas pelos seus outros componentes, devendo ser observados os conceitos de sinergismo, antagonismo e aditividade.

Pesquisas *in situ*, considerando como matriz a carne e a elaboração de pratos processados têm demonstrado a viabilidade e o sucesso dos antioxidantes naturais na redução da oxidação lipídica. El-Alim et al. (1999) concluíram que várias ervas secas utilizadas na culinária (manjerona, manjerona selvagem, cravo-da-índia, hortelã-pimenta, noz-moscada, *curry*, canela, manjerição, salvia, tomilho e gengibre) foram eficientes em inibir a oxidação lipídica em carne de frango moída crua e cozida, durante o armazenamento. Resultados positivos com a carne de frango foram também obtidos com o uso de extrato de folhas secas de alecrim (RACANICCI et al., 2004; BRAGAGNOLO et al., 2005). Fasseas et al. (2007) demonstraram um controle na oxidação lipídica nas carnes de suínos e bovinos com a incorporação de 3 % (p:p) de óleo essencial de orégano ou sálvia. Antes, Botsoglou et al. (2003 a) já haviam comprovado uma forte ação antioxidante do óleo de orégano (200 mg / kg) na carne de peru crua e cozida, sob refrigeração.

Fратиanni et al. (2010) avaliaram os efeitos do óleo essencial de tomilho sobre o armazenamento de carne fresca de peito de frango a 4 °C e observaram uma inibição na peroxidação lipídica e na deterioração das proteínas sarcoplasmáticas, ajudando a preservar a carne mesmo após duas semanas de armazenamento. Além disso, o óleo essencial de tomilho diminuiu para 50 % o conteúdo microbiano total em relação às amostras de controle, reduzindo eficazmente os processos deteriorantes na carne de frango e prolongando a vida útil do produto fresco. Dashti et al. (2015) avaliaram os níveis de 0,05; 0,1 e 0,2 mL/100 g de óleo essencial de tomilho na elaboração do produto cárneo de frango tipo *nuggets* e constataram um efeito antioxidante, além de uma alta aceitabilidade do produto no teste de avaliação sensorial.

Ainda que as comprovações *in vivo* permaneçam limitadas e pouco exploradas (HASHEMI; DAVOODI, 2011), estes trabalhos evidenciam o potencial a ser explorado com a utilização dos óleos essenciais incorporados nas dietas dos animais de produção e seu efeito na estabilidade oxidativa e vida útil da carne e produtos cárneos.

Em ensaios conduzidos com ratos foi observado um forte efeito antioxidante do timol na proteção de ácidos graxos poli-insaturados em diferentes tecidos analisados (DEANS et al., 1993; YODIN; DEANS, 2000). Na ação de atividade antioxidante em ratos, o eugenol inibiu significativamente o aumento da atividade da enzima transaminase glutâmico-oxaloacética sérica e da necrose celular, concluindo uma ação protetora do eugenol no fígado dos animais (NAGABABU et al., 2010). Desta forma, a suplementação de rações de aves com óleos essenciais seria uma estratégia simples e conveniente para introduzir antioxidantes naturais na carne (BOTSOGLU et al., 2002 b).

A estabilidade oxidativa de carne crua de coelhos suplementados com 3 % de folhas de tomilho foi confirmada durante nove dias de refrigeração (DAL BOSCO et al., 2014). Entretanto, 560 mg/kg de extrato seco de tomilho na dieta das aves não afetou a oxidação lipídica e também as análises sensoriais (KORELESKI; ŚWIĄTKIEWICZ, 2007). Já o óleo essencial de orégano, que é rico nos compostos carvacrol e timol, se mostrou eficiente em conter os processos oxidativos da carne de frango crua e cozida quando incluído na quantia de 100 mg/kg na dieta (BOTSOGLU et al. , 2002 a ; 2003 b). Bölükbaşı et al. (2006) determinaram que as inclusões de 100 ou 200 mg de óleo de tomilho/kg de ração foram eficientes em manter os níveis de malonaldeído (produto na oxidação) na carne de coxa e peito de frangos abaixo daqueles gerados pelo grupo controle (sem adição de antioxidantes), sendo inclusive o nível de 200 mg/kg com melhor proteção antioxidante do que o resultado com a vitamina E na carne da coxa.

Luna et al. (2010) suplementaram a dieta de frangos de corte, não com o óleo inteiro, e sim com os compostos de timol e carvacrol, e também obtiveram efeitos significativos na melhoria da conservação da carne de frango. Os autores compararam um grupo controle negativo (sem antioxidante); controle positivo (150 mg/kg de BHT); 150 mg/kg de timol e 150 mg/kg de carvacrol, sendo observada um menor nível de malonaldeído na coxa aos cinco dias de refrigeração apenas nos tratamentos contendo os compostos timol e carvacrol. HASHEMIPOUR et al. (2013) concluíram que a suplementação na ração contendo uma mistura igual de timol e carvacrol em diferentes níveis (0, 60, 100 e 200 mg/kg de dieta) aumentou linearmente as atividades de superóxido dismutase e glutathione peroxidase e diminuiu o nível de malonaldeído no músculo da coxa aos 42 dias de idade e no soro e fígado nos dias 24 e 42 dos frangos de corte. Também Saadat Shad et al. (2016) confirmaram que tanto a inclusão na dieta das aves de timol

(250 mg/kg) como a de carvacrol (300 e 500 mg/kg) aumentaram significativamente a atividade da glutathione peroxidase no soro em comparação com o grupo de controle.

8. Referências

- ABDEL-WARETH, A. A. A. et al. Effects of thyme and oregano on growth performance of broilers from 4 to 42 days of age and on microbial counts in crop, small intestine and caecum of 42-day-old broilers. **Animal feed science and technology**, v. 178, n. 3, p. 198-202, 2012.
- AGUIRRE, J.M.; TRAVAGLINI, D.A.; SILVEIRA, E.T.F. **Desidratação de ovos**. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1979. p.261-287.
- AKINMOLADUN, Afolabi C. et al. Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimum*. **Scientific Research and Essays**, v. 2, n. 5, p. 163-166, 2007.
- ALAHAKOONA, A. U., et al. Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 37–49, 2015.
- ALALI, W. Q. et al. Effect of essential oil compound on shedding and colonization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in broilers. **Poultry science**, v. 92, n. 3, p. 836-841, 2013.
- ALIPOUR, Fahimeh et al. Effect of plant extracts derived from thyme on male broiler performance. **Poultry science**, v. 94, n. 11, p. 2630-2634, 2015.
- ALVARENGA BOTREL, Diego et al. Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 11, p. 2289-2296, 2012.
- AMERAH, A. M.; MATHIS, G.; HOFACRE, C. L. Effect of xylanase and a blend of essential oils on performance and *Salmonella* colonization of broiler chickens challenged with *Salmonella* Heidelberg. **Poultry science**, v. 91, n. 4, p. 943-947, 2012.
- ANDERSON, ES. Drug resistance in *Salmonella typhimurium* and its implications. **Br Med J**, v.3, p. 333-339, 1968. Disponível em: <doi: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.3.5614.333>>.

ANDERSSON, Dan I.; HUGHES, Diarmaid. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 465-478, 2014.

ANVISA, 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/anvisaegis/decretos/50040_61.htm. Acesso em 10 de agosto de 2017.

AVALTRONI, F.; BOUQUERAND, P. E.; NORMAND, V. Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 3, p. 323-334, 2004.

AWAH, Francis M. et al. Antioxidant activity, nitric oxide scavenging activity and phenolic contents of *Ocimum gratissimum* leaf extract. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 23, p. 2479-2487, 2010.

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

BASER, K. Husnu Can; BUCHBAUER, Gerhard (Ed.). **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC Press, 2015.

BEN ARFA, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149-154, 2006.

BERGQUIST, Dwight H. **Spray dryer**. U.S. Patent n. 4,358,341, 9 nov. 1982.

BOLUKBASI, S. C.; ERHAN, M. K.; OZKAN, A. Effect of dietary thyme oil and vitamin E on growth, lipid oxidation, meat fatty acid composition and serum lipoproteins of broilers. **South African Journal of Animal Science**, v. 36, n. 3, p. 189-196, 2006.

BOTSOGLU, N. A. et al. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 62, n. 2, p. 259-265, 2002 a.

- BOTSOGLOU, N. A., et al.. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. **British Poultry Science.**, v. 43, p. 223–230, 2002 b.
- BOTSOGLOU, N. A. et al. The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 65, n. 3, p. 1193–1200, 2003 a.
- BOTSOGLOU, N. A. et al. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation. **Food Research International**, v. 36, n. 3, p. 207–213, 2003 b.
- BOU, R. et al. Dose and duration effect of α -tocopheryl acetate supplementation on chicken meat fatty acid composition, tocopherol content, and oxidative status. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.5020-5026, 2006.
- BOU, R. et al. Dietary Strategies to Improve Nutritional Value, Oxidative Stability, and Sensory Properties of Poultry Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 49, p. 800–822, 2009.
- BRAGAGNOLO, N. **Aspectos comparativos entre carnes segundo a composição de ácidos graxos e teor de colesterol.** SEGUNDA CONFERENCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA. 2001.
- Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais01cv2_bragagnolo_pt.pdf>.
- Acesso em: 29 de outubro de 2012.
- BRAGAGNOLO, Neura; DANIELSEN, Bente; SKIBSTED, Leif H. Effect of rosemary on lipid oxidation in pressure-processed, minced chicken breast during refrigerated storage and subsequent heat treatment. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 5, p. 610–615, 2005.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA. 2014. Disponível em <http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf>. Acesso em: 13 de junho de 2015.

- BRASIL. Ministério da Saúde. Atribuição de Função de Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos – SVS/MS, 1998. Disponível em <<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:ahNJY4WNYZEJ:portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Portaria%252Bn%2525C2%2525BA%252B1004%25252C%252Bde%252B11%252Bde%252Bdezembro%252Bde%252B1998.pdf/41e1bc8f-b276-4022-9afb-ff0bb3c12c0c+&cd=3&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br&client=firefox-b>>. Acesso em 09 de novembro de 2015.
- BUCKLE, J. Clinical Aromatherapy: Essential Oils in Practice, 2015, 375p. Third edition. Churchill Livingstone, 2015. Elsevier Inc. ISBN: 978-0-7020-5440-2
- BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 467-483, 2011.
- BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- BUSATTA, C. et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food microbiology**, v. 25, n. 1, p. 207-211, 2008.
- CALLIGARISA, S., et al. Shelf life assessment of food undergoing oxidation - A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 2015. Disponível em: <[doi:10.1080/10408398.2013.807222](https://doi.org/10.1080/10408398.2013.807222)>. Acesso em 12 de novembro de 2015.
- CALO, Juliany Rivera et al. *Salmonella* Heidelberg Strain Responses to Essential Oil Components. **Journal of Food Research**, v. 4, n. 5, p. 73, 2015.
- CAPASSO, Francesco. **Phytotherapy: a quick reference to herbal medicine**. Springer Science & Business Media, 2003.
- CARLET, J., et al. Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, 1:11 2012. Disponível em: <<http://www.aricjournal.com/content/1/1/11>>. Acesso em 04 de outubro de 2015.

- CARNEIRO, Helena CF et al. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 443-451, 2013.
- CAROCHO, Márcio; FERREIRA, Isabel CFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.
- CARSON, Christine F.; HAMMER, Katherine A. Chemistry and bioactivity of essential oils. **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**, p. 203-238, 2011.
- CELIK TAS, O. Yesil et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553-559, 2007.
- CERISUELO, A. et al. The impact of a specific blend of essential oil components and sodium butyrate in feed on growth performance and *Salmonella* counts in experimentally challenged broilers. **Poultry science**, v. 93, n. 3, p. 599-606, 2014.
- CHANG, Xianmin; ALDERSON, Peter G.; WRIGHT, Charles J. Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1, p. 216-223, 2008.
- CHAUHAN, Anil Kumar; KANG, Sun Chul. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* ser. typhimurium *in vitro* and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. **Research in microbiology**, v. 165, n. 7, p. 559-565, 2014.
- CHEN, C. H., A. M. PEARSON; J. I. GRAY. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. **Food Chemistry**, v. 43, p.169–249, 1992.
- CHORIANOPOULOS N.; et al. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 8261-8267, 2004.

- CONSENTINO, S. et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in applied microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130-135, 1999.
- CORRIER, D. E., et al. Presence of *Salmonella* in the crop and ceca of broiler chickens before and after preslaughter feed withdrawal. **Poultry Science**, v.78, p.45-49, 1999.
- CORTINAS, L.; et al. Influence of the Dietary Poly-unsaturation Level on Chicken Meat Quality: Lipid Oxidation. **Poultry Science**, v.84, p.48-55, 2005.
- DAL BOSCO, A. et al. Effect of dietary supplementation of Spirulina (*Arthrospira platensis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*) on rabbit meat appearance, oxidative stability and fatty acid profile during retail display. **Meat science**, v. 96, n. 1, p. 114-119, 2014.
- DASHTI, Neda Ganjali et al. Antioxidant Effect of Thyme Essential Oil on Oxidative Stability of Chicken Nuggets. **International Journal of Food Engineering**, v. 1, n. 2, 2015.
- DAWIDOWICZ, Andrzej L.; OLSZOWY, Małgorzata. Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. **Natural product research**, v. 28, n. 22, p. 1952-1963, 2014.
- DEANS, S.G.; et al. Promotional effects of plant volatile oils on the polyunsaturated fatty acid status during aging. **Journal Essential Oil Research**, v. 16, p.71–74, 1993.
- DE BARROS FERNANDES, Regiane Victória; BORGES, Soraia Vilela; BOTREL, Diego Alvarenga. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 524-532, 2014.
- DELAZARI, I. Abate e processamento de carne de aves para garantia da qualidade. In: **CONFERÊNCIA APINCO**. 2001. p. 191-203.
- DEVI, K.P., et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107–115, 2010.

- DE VOS, Paul et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010.
- DI PASQUA, Rosangela et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, 2006.
- DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p.308– 316, 2000.
- DORMAN, H. J. D.; SURAI, P.; DEANS, S. G. *In vitro* antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. **Journal Essential Oil Research**, v. 12, p.241–248, 2000.
- DUARTE, Dalila Angélica Moliterno et al. Occurrence of Salmonella spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 569-573, 2009.
- DUDONNÉ, S.; et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1768–1774, 2009.
- EFSA. European Food Safety Authority.EFSA Journal, 12(2), 3547, 2014.
- EFSA, 2011. Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS): Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxyanisole–BHA (E 320) as a food additive. EFSA J. 9(10), 2392. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2392. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2392.pdf>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2017.
- EFSA, 2012. Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS); Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. EFSA J. 10(3), 2588. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2588. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2588.pdf>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2017.

- EL-ALIM, Souzan Saad Latif Abd et al. Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 2, p. 277-285, 1999.
- FALOWO, Andrew B.; FAYEMI, Peter O.; MUCHENJE, Voster. Natural antioxidants against lipid-protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. **Food Research International**, v. 64, p. 171-181, 2014.
- FARAG, R.S., et al. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. **Journal of Food Protection**, v 52 (9), p. 665– 667, 1989.
- FDA. Food and Drug Administration. FDA Takes Significant Steps to Address Antimicrobial Resistance. Estados Unidos, 2013.
- Disponível em: <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm378166.htm>>.
- Acesso em: 20 de outubro de 2015.
- FELLENBERG, M. A.; SPEISKY, H. Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, n. 01, p. 53-70, 2006.
- FLETCHER, D. L. Poultry meat quality. **World's Poultry Science Journal**, v. 58, n. 02, p. 131-145, 2002.
- FRANZ, Chlodwig; NOVAK, Johannes. Sources of essential oils. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC, New York, p. 39-81, 2009.
- FRATIANNI, Florinda et al. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. **Journal of food science**, v. 75, n. 8, p. M528-M535, 2010.
- FREIRE, Cristiana M. Murbach; MARQUES, Márcia Ortiz M.; COSTA, Mirtes. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, n. 1, p. 161-166, 2006.
- GALBIATI, V. et al. Further development of the NCTC 2544 IL-18 assay to identify *in vitro* contact allergens. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 3, p. 724-732, 2011.

GANG, David R. et al. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. **Plant Physiology**, v. 125, n. 2, p. 539-555, 2001.

GHARSALLAOUI, Adem et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GRAY, J.I.; GOMAA, E.A; BRUCKLEY, D.J. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science**, v.43, p.111-123, 1996.

HASHEMI, S. R.; DAVOODI, H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. **Veterinary Research Community**, v.35, p.169-180, 2011.

HASHEMIPOUR, Hamideh et al. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 8, p. 2059-2069, 2013.

HAUTRIVE, Tiffany Prokopp et al. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, COLESTEROL E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE CORTES CÁRNEOS COMERCIAIS DE AVESTRUZ, SUÍNO, BOVINO E FRANGO. **Brazilian Journal of Food & Nutrition/Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 2, 2012.

HELANDER, Ilkka M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

HOFFMAN-PENNESI, D.; WU, C. The effect of thymol and thyme oil feed supplementation on growth performance, serum antioxidant levels, and cecal Salmonella population in broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 19, n.4, p. 432-443, 2010.

HYLDGAARD M., MYGIND T., MEYER R. L.. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Front Microbiog**y, v. 3, n. 12, 2012.

HUMPHREY, T., JORGENSEN, F. Pathogens on meat and infection in animals- Establishing a relationship using *campylobacter* and *salmonella* as example. **Meat Science**, v. 74, p.89-97, 2006.

- HUSSAIN, Abdullah Ijaz et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food chemistry**, v. 108, n. 3, p. 986-995, 2008.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/search.php?cx=009987501641899931167%3Ajwf5bx4tx78&cof=FORID%3A9&ie=UTF-8&ie=ISO-8859-1&oe=ISO-8859-1&sa=&q=BHT#gsc.tab=0&gsc.q=BHT&gsc.page=1>>. Acesso em 25 de outubro de 2016.
- JAFARI, Seid Mahdi et al. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816-835, 2008.
- JAYASENA, Dinesh D.; JO, Cheorun. Potential application of essential oils as natural antioxidants in meat and meat products: a review. **Food Reviews International**, v. 30, n. 1, p. 71-90, 2014.
- JENSEN, C.; et al. Influence of the oxidative quality of dietary oil on broiler meat storage stability. **Meat Science**, v.47, p. 211-222, 1997.
- KÄHKÖNEN, Marja P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.
- KAHL, R.; KAPPUS, H. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. **Zeitschrift fur Lebensmittel-untersuchung und-forschung**, v. 196, n. 4, p. 329-338, 1993.
- KATSUBE, T.; et al.. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay and Folin-Ciocalteu assay. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2391-2396, 2004.
- KOLLANOOR JOHNY, A., et al. Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol and thymol on *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents *in vitro*. **Journal Applied Poultry Research**, v.19, p. 237–244, 2010 a.

- KOLLANOOR JOHNY, A., T. A. HOAGLAND; K. VENKITANARAYANAN. Effect of subinhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the sensitivity of multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 to antibiotics. **Foodborne Pathology. Disease**, v.7, p.1165–1170, 2010 b.
- KORELESKI, J.; SWIATKIEWICZ, S. Dietary supplementation with plant extracts, xanthophylls and synthetic antioxidants: Effect on fatty acid profile and oxidative stability of frozen stored chicken breast meat. **Journal of Animal Feed Science**, v. 16, p. 463–471, 2007.
- KRISHNAN, Savitha; BHOSALE, Rajesh; SINGHAL, Rekha S. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. **Carbohydrate polymers**, v. 61, n. 1, p. 95-102, 2005.
- KRISHNAIAH, Duduku; SARBATLY, Rosalam; NITHYANANDAM, Rajesh. Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. **Chemical engineering research and design**, v. 90, n. 5, p. 622-632, 2012.
- LADIKOS, D.; LOUGOVOIS, V. Lipid oxidation in muscle foods: A review. **Food chemistry**, v. 35, n. 4, p. 295-314, 1990.
- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.
- LANGEVELD, Wendy T.; VELDHUIZEN, Edwin JA; BURT, Sara A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical reviews in microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76-94, 2014.
- LEE, S. K.; MEI, L.; DECKER, E. A. Influence of sodium chloride on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation in frozen ground pork. **Meat Science**, v. 46, n. 4, p. 349-355, 1997.
- LEE, K. W. et al. Cinnamaldehyde, but not thymol, counteracts the carboxymethyl cellulose-induced growth depression in female broiler chickens. **Int. J. Poult. Sci**, v. 3, n. 9, p. 608-612, 2004.

- LEE, S.J.; et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, p. 131-137, 2005.
- LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, p.371-387, 2013.
Disponível em: <doi:10.1038/nrd3975>.
- LIMA, C. B., et al. Capacidade antioxidante de óleos de plantas do cerrado suplementados na dieta de frangos de corte em bolas de carne de coxa e sobrecoxa. IN: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2013, Campinas/SP. Anais... Campinas/SP. FACTA, 2013.
- LIN, C.F.; et al. Effects of oxidized dietary oil and antioxidant supplementation on broiler growth and meat stability. **British Poultry Science**, v. 30, p. 855-864, 1989.
- LUNA, A.; et al. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. **Poultry Science**, v.89, p.366-370, 2010.
- MANTEN, A. The non-medical use of antibiotics and the risk of causing microbial drug-resistance. **Bulletin of the World Health Organization**, 1963. Disponível em:< ncbi.nlm.nih.gov>.
- MATHER et al. Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella Typhimurium* DT104 in different hosts. **Science**, v. 341, p.1514, 2013. Disponível em: <doi:10.1126/science.1240578>.
- MATHIAS, Simone Pereira et al. Alterações oxidativas (cor e lipídios) em presunto de peru tratado por Alta Pressão Hidrostática (APH). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 852-857, 2010.
- MILADINOVIĆ, Dragoljub L. et al. Investigation of the chemical composition–antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 403, n. 4, p. 1007-1018, 2012.
- MIN, B; AHN, D. U. Mechanism of Lipid Peroxidation in meat and meat products -A Review. **Food Science Biotechnology**, v. 14, p. 152-163, 2005.
- MITSUMOTO, M., et al. Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. **Meat Science**, v. 69, n.4, p. 773-779, 2005.

- MORRISSEY, P. A.; et al. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, n.1, p.s73-s86, 1998.
- NAGABABU, Enika et al. Assessment of antioxidant activity of eugenol in vitro and *in vivo*. **Free Radicals and Antioxidant Protocols**, p. 165-180, 2010.
- NAGABABU, E.; LAKSHMAIAH, N. Inhibitory effect of eugenol on non-enzymatic lipid peroxidation in rat liver mitochondria. **Biochemical Pharmacology**, v. 43, n. 11, p. 2393-2400, 1992.
- NAGABABU, E.; LAKSHMAIAH, N. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and monooxygenase activities by eugenol. **Free radical research**, v. 20, n. 4, p. 253-266, 1994.
- NAIDU, K. A. Eugenol—an inhibitor of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 53, n. 5, p. 381-383, 1995.
- NAJAFI, P.; TORKI, M. Performance, blood metabolites and immunocompetence of broiler chicks fed diets included essential oils of medicinal herbs. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 7, p. 1164-1168, 2010.
- NGUYEN, Dac Vinh, et al. Antioxidant effect of thyme in rape-seed oil. **Section Cellular and Molecular Biology**, 2000. Disponível em: < <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=SK2000000433>>
- NUNES, Graciele Lorenzoni et al. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60-68, 2015.
- OCAK, N. et al. Performance of broilers fed diets supplemented with dry peppermint (*Mentha piperita* L.) or thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves as growth promoter source. **Czech Journal of Animal Science**, v. 53, n. 4, p. 169, 2008.
- OLIVEIRA, S.D., et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 297–305, 2005.

- OSAWA, Cibele Cristina; DE FELÍCIO, Pedro Eduardo; GONÇALVES, Lireny Ap Guaraldo. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655, 2005.
- PANDEY, Abhay Kumar; SINGH, Pooja; TRIPATHI, Nijendra Nath. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 9, p. 682-694, 2014.
- PANG, Sook Fun; YUSOFF, Mashitah M.; GIMBUN, Jolius. Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 159-165, 2014.
- PEÑALVER P.; et al. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. **APMIS**, v. 113, p. 1-6, 2005.
- PENZ JUNIOR, A.M.; KOLLER, F. L. **A resposta brasileira as exigências no uso de antimicrobianos**. In.: XIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos – ABRAVES . p. 232. Anais... Florianópolis, 2007.
- PEI, Rui-song et al. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of food science**, v. 74, n. 7, 2009.
- POPE, M. J.; CHERRY, T. E. An evaluation of the presence of pathogens on broilers raised on poultry litter treatment-treated litter. **Poultry Science**, v. 79, n. 9, p. 1351-1355, 2000.
- RACANICCI, Aline MC et al. Antioxidant effect of dittany (*Origanum dictamnus*) in pre-cooked chicken meat balls during chill-storage in comparison to rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 6, p. 521-524, 2004.
- RADHA KRISHNAN, K, et al. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.171, p.32-40, 2014.
- REMUS, A. et al. A meta-analysis of the feed intake and growth performance of broiler chickens challenged by bacteria. **Poultry science**, v. 93, n. 5, p. 1149-1158, 2014.

- REPETTO, Marisa; SEMPRINE, Jimena; BOVERIS, Alberto. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In: **Lipid peroxidation**. InTech, 2012.
- RHAYOUR K., et al. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal Essential Oil Research**, v. 15, p. 356–362, 2003.
- RHEE, K. S.; ANDERSON, L. M.; SAMS, A. R. Lipid oxidation potential of beef, chicken, and pork. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 1, p. 8-12, 1996.
- ROBERT, Paz et al. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. **International journal of food science & technology**, v. 45, n. 7, p. 1386-1394, 2010.
- ROBEY, W.; SHERMER, W. The damaging effects of oxidation. *Feed Mix*, v.2, n.5, p.22-26, 1994.
- ROBY, Mohamed Hussein Hamdy et al. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 827-831, 2013.
- RODRIGUES, R.A.F. (2004). Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por spray drying, contendo extrato de café crioucentrado. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- ROMANE, Abderrahmane; HARRAK, Rajae; BAHRI, Fouad. Use thyme essential oils for the prevention of salmonellosis. In: **Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathogen**. InTech, 2012.
- RYMER, C.; GIVENS, D. I. N-3 fatty acid enrichment of edible tissue of poultry: A review. **Lipids**, v. 40, p. 121–130, 2005.
- SAADAT SHAD, H. et al. Effects of Thymol and Carvacrol on Productive Performance, Antioxidant Enzyme Activity and Certain Blood Metabolites in Heat Stressed Broilers. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 6, n. 1, p. 195-202, 2016.
- SACCHETTI, Gianni et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.

- SANTOS, A. S., et al. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. 2004. Comunicado Técnico 99. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/402448/1/com.tec.99.pdf>>.
- SANTURIO, J. M., et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.803-808, 2007.
- SARTORATO A., et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p.273-280, 2004.
- SEOW, Yi Xin et al. Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 5, p. 625-644, 2014.
- SEVANIAN, Alex; HOCHSTEIN, Paul. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. **Annual review of nutrition**, v. 5, n. 1, p. 365-390, 1985.
- SERVAT, L. Atividade antinociceptiva e anticâncer *in vitro* de microencapsulados produzidos com extrato bruto e vouacapanos obtidos das sementes de *Pterodon pubescens* Benth. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, Piracicaba, SP, 2010, 119 pp.
- SHAN, Bin et al. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7749-7759, 2005.
- SI, W. et al. *In vitro* assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde towards *Salmonella* serotype Typhimurium DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 6, p. 1282-1291, 2006.
- SIMON, James E. et al. Basil: a source of essential oils. **Advances in new crops**, p. 484-489, 1990.
- SMET, K.; et al. Lipid and Protein oxidation of broiler meat as influenced by dietary natural antioxidant supplementation. **Poultry Science**, v.87, p. 1682-1688, 2008.
- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, Lorna. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food microbiology**, v. 18, n. 4, p. 463-470, 2001.

- SOLADOYE, O. P. et al. Protein oxidation in processed meat: Mechanisms and potential implications on human health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 2, p. 106-122, 2015.
- THANISSERY, R.; KATHARIOU S.; SMITH D. P. .Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit *Salmonella* and *Campylobacter* *in vitro*. **Journal Applied Poultry Research**, v. 23, p. 221–227, 2014.
- TIIHONEN, Kirsti et al. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. **British poultry science**, v. 51, n. 3, p. 381-392, 2010.
- TOGHYANI, Majid et al. Performance, immunity, serum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 40, p. 6819-6825, 2010.
- TUREK, Claudia; STINTZING, Florian C. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40-53, 2013.
- UPADHYAY, A., et al.. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis. **BioMed Research International**, v. 2014, 18p, 2014.
- USDA. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service.2012. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/data-collection-and-reports/microbiology/annual-serotyping-reports>. Acesso em: 24 de outubro de 2015.
- VALENZUELA, Alfonso; SANHUEZA, Julio; NIETO, Susana. Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. **Grasas y aceites**, v. 54, n. 3, p. 295-303, 2003.
- VARDAR-ÜNLÜ, Gülhan et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 63-67, 2003.
- VASCONCELOS SILVA, M. G. et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 32-34, 1999.

- VENKITANARAYANAN, K., et al. Use of plant-derived antimicrobials for improving the safety of poultry products. **Poultry Science**, v. 92, n.2, p.493-501, 2013.
- VIEIRA, R. F; et al. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on oil volatile constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 287-304, 2001.
- WALTON, D. E.; MUMFORD, C. J. The morphology of spray-dried particles: the effect of process variables upon the morphology of spray-dried particles. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 77, n. 5, p. 442-460, 1999.
- WANG, Lijun; WELLER, Curtis L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.
- WANG, Yu et al. Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 3, p. 391-396, 2009.
- WEI, A; SHIBAMOTO, T. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p. 7218-7225, 2010.
- WHITE, D. G., et al. The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats. **New England Journal Medicine**; v.345, p. 1147-1154, 2001.
- WHO. World Health Organization. Estimates of the global burden of foodborne diseases, 2010. https://extranet.who.int/sree/Reports?op=vs&path=/WHO_HQ_Reports/G36/PROD/EXT/FoodborneDiseasesBurden. Acesso em: 22 de setembro, 2016.
- WOJDYŁO, A.; OSZMIAN'SKI, J.; CZEMERYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, p. 940–949, 2007.
- WOODS, L. F. J.; CHURCH, P. N. Strategies for extending the shelf-life of poultry meat products. In: RICHARDSON, R. I.; MEAD, G. C. Poultry Science Symposium Series. Oxon, U.K. CABI Publishing. 1999. p. 297-311.

- XIAO, S. et al. Effects of diet, packaging, and irradiation on protein oxidation, lipid oxidation, and color of raw broiler thigh meat during refrigerated storage. **Poultry Science**, v. 90, n. 6, p. 1348-1357, 2011.
- YANISHLIEVA, Nedyalka V. et al. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 59-66, 1999.
- YANISHLIEVA, Nedyalka V.; MARINOVA, Emma; POKORNÝ, Jan. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 9, p. 776-793, 2006.
- YOUDIM, K. A.; DEANS, S. G. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the aging rat brain. **British Journal Nutrition**, v. 83, p. 87-93, 2000.
- ZHAO, S., et al. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among salmonella from retail foods of animal: NARMS Retail Meat Surveillance. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3(1), p. 106-117, 2006.
- ZHANG, W., et al. Effects of dietary oxidation on the quality of broiler breast meat. **Animal Industry Report**, v. 657, n. 1, p. 48, 2011.
- ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 5165-5170, 2001.
- ZHOU, Feng et al. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Safety**, v. 27, n. 2, p. 124-133, 2007.

- CAPÍTULO 3 -

EFFECTS OF ESSENTIAL OILS ON *Salmonella* GROWTH

**Effects of essential oils on *Salmonella* Enteritidis growth:
in vitro and in vivo assays**

FIGUEIREDO, Adriana Nogueira¹; DUARTE, Marta Cristina Teixeira^{2*}

¹Department of Food Science, University of Campinas (UNICAMP), Campinas/SP, Brazil.

² Department of Microbiology, Research Center for Chemistry, Biology and Agriculture (CPQBA),

University of Campinas (UNICAMP), Paulinia/SP, Brazil.

* Phone: +55 19 2139- 2872 email: mduarte@cpqba.unicamp.br

To be submitted to *Poultry Science*

ABSTRACT: An increased demand for products antibiotic free have forced the animal industry to find alternatives to traditional growth promoters. Thymol, carvacrol and eugenol presents in natural plant extracts are recognized for their antimicrobial properties. We hypothesized that essential oils from *Thymus vulgaris* (thymol and carvacrol) and *Ocimum gratissimum* (eugenol) could exclude *Salmonella* Enteritidis in the intestinal tract of chickens. We compared commercial and experimental produced oils from *T. vulgaris* and *O. gratissimum* *in vitro*. Experimental oils extracted from fresh leaves presented a less diversified gas chromatography-mass spectrophotometer compounds profile than commercial oils. Pure oils and essential oils blend (EOB) based on the carvacrol + thymol:eugenol concentration were prepared and the minimum inhibitory concentration (MIC) determined. The value of 700 µg/mL of the EOB at the proportion 1:3 was efficient to inhibit the growth of strains of *S. Enteritidis*. In order to evaluate the growth kinetics of *S. Enteritis* MB089-R (rifamycin resistant, 64 µg/mL), LB broth was inoculated with 0, 70, 140 and 700 µg/mL of EOB and the growth curves were determined. Levels of EOB evaluated were efficient to decrease the bacterial growth rate and increased the doubling time ($P < 0.05$). Next, spray dried microencapsulated EOB (20 % oil + 80 % maltodextrin) was fed to chicks at different levels (0, 70, 140 and 700 ppm of EOB) on the diets and did not negatively affect their performance ($P > 0.05$). Finally, 2 days old chickens orally challenged with 10^5 CFU of *S. Enteritis* MB089-R were fed the diets containing the same levels of microencapsulated EOB used in the performance experiment. The cecal *S. Enteritidis* presence was determined at 1, 2, 3, 11 and 25 days after challenge using XLT4 agar. It was observed a

reduction of the amount of *S. Enteritidis* present in the cecal microbiota of chickens fed diets containing 700 ppm of microencapsulated EOB. The blend of essential oils from *T. vulgaris* and *O. gratissimum* could be effective to control *S. Enteritidis*.

Key words: eugenol, thymol, chickens, microencapsulation, cecal microbiota.

INTRODUCTION

A large proportion of population has been suffering the effects of worldwide diseases caused by foodborne pathogenic bacteria, particularly *Salmonella* spp. (WHO, 2010). Although antimicrobial agents have supported to control these bacteria, the extensive misuse of antibiotics in animal farms as growth promoter have contributed the acquired resistance to these drugs, remaining of great apprehension (WHO, 2015). Nowadays, consumers are aware on the bacteria resistance raising questions about it and request for products free of antibiotics in the animal production. The new demands have forced animal feed industry to look for alternatives as essential oils (EO). These compounds as the derivate from phenol like thymol, carvacrol and eugenol present a free hydroxyl group with proved *in vitro* antibacterial action (Lambert et al., 2001; Bem Arfa et al., 2006; Di Pasqua et al., 2006; Devi et al., 2010). In the last years, experiments with broilers fed a blending of EO and their compounds expressed mainly for thymol (Amerah et al., 2012; Alali et al., 2013; Cerisuelo et al., 2014; Thanissery et al., 2014) and less for eugenol (Kollanoor Johny et al., 2012 a, b) have certified relevant action to prevent *Salmonella* colonization. However, it is still limited numbers of trials assessing antimicrobial effects of EO are performed *in vivo*, and many of them present a lack of consistency in the results indicating that more research is needed for safe and effective use. Supported on our previous experience with EO from Lamiaceae Family in screening tests to control bacteria (Sartorato et al., 2004; Duarte et al., 2007) we assumed that would be possible to develop a natural product based on these compounds to control *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in chickens. The chosen aromatic species were *Thymus vulgaris* and *Ocimum gratissimum* and they are known for their concentration of thymol and carvacrol (Lee et al., 2005; Sacchetti et al., 2005; Romane et al., 2012) and eugenol (Simon et al, 1999; Vieira et al., 2001; Freire et al., 2006), respectively. Finally, a number of *in vitro* and *in vivo* trials were conducted to investigate and to lay down the

optimal level of these EO to add in broiler diet and your contribution to regulate *Salmonella* colonization in the cecum and environment.

MATERIAL AND METHODS

Commercial and Experimental Essential Oils.

First, we have chosen commercial oil (Terra Flor Aromatherapy company) from *Thymus vulgaris* (thyme) and *Ocimum gratissimum* (basil), both belonging to the Lamiaceae Family and being products certified by IBD (<http://ibd.com.br/pt/IngredienteNaturalIbd.aspx>) as natural ingredients. Additionally, aerial parts of *T. vulgaris* and *O. gratissimum* were collected from the Collection of Medicinal and Aromatic Plants (CMAP) at the University of Campinas (Campinas, Brazil) in February, May and August, representing Summer, Autumn and Winter, respectively in Brazil (same soil and harvest conditions). The specimens (*T. vulgaris* CPMA 2171; *O. gratissimum* CPMA 2191) were identified and authenticated by Dr. Glyn Mara Figueira, Department of Agrotecnology, University of Campinas, São Paulo, Brazil. Fresh material of *T. vulgaris* and *O. gratissimum* were subjected to hydrodistillation for 3 h using a Clevenger apparatus as described previously (Duarte et al., 2007). Essential oils (EO) were stored at -25°C in sealed glass vials prior to further analyses. Previous to GC–Mass analyses the samples were dissolved in ethyl acetate (10 mg/mL). For the antibacterial activity assays, EO were solubilized in Tween 80 (Sigma – Aldrich, Germany) solution in water (0.1 %) and dimethyl sulfoxide (DMSO- maximum 5 %) (Merck, Darmstadt, Germany).

Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC–MS)

The EO were injected to GC-MS apparatus (Agilent 6890) equipped with a HP-5MS fused silica column (30 m x 0.25 mm x 0.25 μm) and interfaced with an Agilent 5975 mass selective detector. The oven temperature was programmed from 60 - 250 $^{\circ}\text{C}$ at a rate of 3 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Helium was used as carrier gas at a flow rate of 1 mL/min. Other conditions of the instrument were as follows: ionization voltage 70 (e) V, injector temperature 220 $^{\circ}\text{C}$, and ion source temperature 200 $^{\circ}\text{C}$. The constituents of the EO were identified by comparing GC relative retention times based

on the comparison of their mass spectra with those obtained from the NIST 98 and Wiley 275 libraries as well as by comparison of the fragmentation patterns reported in the Adams (2001) literature. The composition was reported as a relative percentage of the total peak area. Quantification of thymol, carvacrol and eugenol were made with those of pure standards (Sigma-Aldrich, Germany).

Bacterial Strain and Antibiotic Resistance

Five different strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis were isolated from the field chicken and kindly supplied from Dr. Edir Nupomuceno Silva from University of Campinas - UNICAMP (Campinas, SP- Brazil). The serotypes were kept in Agar Nutrient (Merck Darmstadt, Germany) containing (g / L): meat peptone, 5.0; meat extract 3.0 and agar-agar, 12.0 and were used for determined the minimum inhibitory concentration.

One serotype was randomly chosen to be induced a resistance to antibiotic. Briefly: *S. Enteritidis* was grown in Luria-Bertani (LB; Difco™) broth for 24 h under anaerobic conditions at 37°C. A stock solution was made inoculating 10 µL of LB *Salmonella* in 10 mL of LB broth and incubated in same condition (24 h; 37°C). Another stock solution with rifampicin antibiotic was prepared (10 mg/mL of methanol). Daily, 10 µL of *Salmonella* stock solution was inoculated in 10 mL of LB containing 2; 4; 8; 16; 32 and 64 µg/mL of rifampicin, per day respectively. At the end of the induction procedure, 100 µL of the solution containing the bacterium grown in 64 µg/mL of rifampicin was seeded on the plate with LB broad without antibiotic and incubated at 37 ° C for 24 h. This step was repeated for five days. To confirm the resistance, the culture was plated in XLT4 agar (Kasvi) containing 64 µg/mL of rifampicin and incubated in same condition (24 h; 37°C). This strain of *S. Enteritidis* MB089-R (rifampicin resistant, 64 µg/mL) was used for further analysis.

Minimum Inhibitory Concentration (MIC) Assay

Pure EO from different seasons and commercial samples were prepared and the minimum inhibitory concentration (MIC) determined using five different strains of *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. In addition, the proportion 1:3 *T. vulgaris*:*O. gratissimum* (w/w)

concentration was established based on our previous work and also due amount of oil produced by each plant tested since *O. gratissimum* presents a higher yield than *T. vulgaris* (Sartorato et al., 2004). Standards of the pure thymol and eugenol (w/w) (1:3) (Sigma – Aldrich, Germany) were tested on the same cultures under identical conditions to compare their activities with those of the investigated oils. The broth micro-dilution method was used to determine MIC according to CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012) guidelines. Firstly, bacteria inoculum was prepared by diluting cell mass in 0.85 % NaCl solution, confirmed in spectrophotometer (UV-mini 1240 – Shimadzu) at 625 nm in order to obtain a range absorbance of 0.08 – 0.10 (10^8 CFU mL⁻¹). Serial 10-fold dilutions were made in saline solution to final concentration of 10^4 CFU mL⁻¹. The stock solution from EO was added in Mueller-Hinton Broth (MHB, Merck, Darmstadt, Germany) medium. The 96-well plastic micro-dilution tray with round bottom wells were prepared by dispensing 100 µL of MHB into each well containing different concentrations of the EO (range of 2000 - 16.5 µg/mL) and 100 µL of the bacterial inoculum, which was corresponding to 10^4 CFU mL⁻¹. Positive and negative controls were considered as follows: positive control: MHB containing DMSO and/or Tween and bacterial inoculum without EO and negative control: MHB containing DMSO and/or Tween 80 and EO without bacterial inoculum. Contents of each well were mixed and incubated at 37 °C for 24 h. Antimicrobial activity was detected by adding 50 µL of 0.5 % TTC (triphenyltetrazolium chloride, Merck) to the aqueous solution. All analyses were performed in duplicate. MIC was defined as the lowest concentration of compounds that inhibited visible growth and was used in subsequent assays.

In vitro Salmonella Growth Rate

The growth kinetics of EO concentrations against *S. Enteritidis* MB089-R strain was determined. Quadruplicate 50-mL Erlernmeyer containing 30 mL LB broth were separately inoculated with 10^6 CFU/mL of *S. Enteritidis* MB089-R strain. Based on the MIC value, three treatments with EO concentrations were selected: 10, 20 and 100 % MIC value plus positive control group (no add EO). Also, one per treatment uninoculated medium with each EO level served as a negative control (blank). Growth cultures were incubated at 37 °C, shaken at 200 rpm (New Brunswick Scientific Incubator Shaker - G25). Growth curves were monitored by turbidity measurements at 600 nm (Genesys 10S uV-Vis Spectrophotometer) at different time intervals

until a constant reading was observed. The doubling time of culture growth was defined as: $T_d = (\ln OD_2 - \ln OD_1) / (t_2 - t_1)$; whereas OD, optical density at 600 nm; t, time (min); 1 and 2 are successive time points in exponential growth phase (Widdel, 2010).

Microencapsulation of Essential Oil

The EO was microencapsulated to be included in the diets of broilers (*in vivo* assays). A micro emulsion containing maltodextrin (MorRex 1910[®] with DE 10 - Corn Products, Mogi Guaçu, SP, Brazil), Tween 80 (Sigma-Aldrich, Germany) and EO were injected to mini spray dryer (Büchi model B-290) varying the inlet temperature of $180 \pm 5^\circ \text{C}$ and 20 % relative oil in relation to total solids (30 %). Other conditions used: aspirator 90 % ($35 \text{ m}^3 \text{ h}^{-1}$), pump 15 % ($4,5 \text{ mL min}^{-1}$) and N_2 as carrier gas (Rodrigues, 2004). The final process resulted in white micro particles water soluble containing in average 20 % of EO and expressed as ppm in the diets. The determination of the moisture of the micro particles was performed in triplicate by Karl-Fisher method (1935).

Diet and Experimental Design

All experiments with animals were approved by the Committee of Ethic in Animal Research (CEAR) at the State University of Campinas (Brazil). Two experiments with broilers were performed to evaluate (1) if EO affect performance from 1 to 21 days of age and (2) *Salmonella* colonization and persistence in chickens from 1 to 24 days of age. The feeding program of both consisted of a starter diet based on corn and soybean meal used during all experimental period. All diets were prepared with the same batch of ingredients and had the same composition and nutritional levels (AME poultry, 3000 kcal/kg; Lysine dig, 1.187 %; Methionine + cystine, 0.867 %, calcium, 0.9 %; phosphorus available, 0.45 %). Diets were formulated to meet or exceed requirements by the National Research Council (1994) for broilers of this age, without antibiotics, anti-coccidials, enzymes and antioxidants (only presented in the premix). The diet ingredient included maltodextrin to replace the test ingredient (microencapsulated EO) (w:w). Chickens from both experiments fed the same diets containing the levels of oils adopted in the *in*

vitro growth experiment (10, 20 and 100 % MIC value, plus positive control group), but in the microencapsulated form and expressed as ppm of EO in the diets.

Experiment 1: Animal performance. Cobb male chickens were raised from 1 to 21 days of age. At 1 d of age, 96 chicks were placed in 16 electrically heated battery cages (6 birds per cage) in a randomized complete block design, with four replicates per treatment (24 birds/treatment). Chickens received mash feed and water *ad libitum* and the room temperature was adjusted to keep them under thermal comfort. Birds were weighed weekly. Mortality was recorded daily. Also, total feed intake was measured per pen at weekly intervals. Feed conversion ratio was adjusted for mortality.

Experiment 2: Salmonella colonization and persistence in chickens. *Salmonella*-free Ross male chicks, hatched from breeders not vaccinated against *Salmonella* were raised from 1 to 24 d of age. At 1 d of age, 225 chicks were housed in 15 cages (15 birds per cage) in a randomized complete block design, with three replicates per treatment (45 birds/treatment). Chickens received mash feed and water *ad libitum* inside a sterilized room, with total control of air, temperature and person transition. Bacterial inoculum was prepared from a frozen suspension of the strain of *S. Enteritidis* MB089-R that was grown in LB broth at 37 °C, aerobically, overnight. At day 2 of age, chicks were orally challenge (by syringe) with 0.1 mL of *S. Enteritidis* MB089-R (10^6 CFU mL⁻¹). A negative control group was included where chickens were administered saline alone. Cecal contents and excreta from each cage were collected at 72 h, 9 and 22 days after following challenge. Six birds per treatment group were euthanized and cecum was aseptically removed. Samples collected from randomized birds (2 cecum per sample) and excretas (per cage) from 24 h period were separately homogenized in pH 7.0 phosphate-buffered saline, and 10-fold serial dilutions were plated on XLT4 agar (Kasvi) containing the appropriate antibiotic and incubated overnight at 37 °C. All analyses for each concentration were performed in triplicate. Uninoculated, control chickens were negative for *Salmonella* throughout the duration of the experiment. At the end of experiment all broilers that remained were weighted and euthanized to collect liver. Body individual weight and relative liver weight were analyzed (24 d old chickens).

Statistical Analysis

The data from *in vitro* growth rate and performance were subjected to analysis of variance procedures appropriate for a completely randomized design using the General Linear Model procedures of SAS Institute. For the different statistical tests, significance was declared at $P < 0.05$ and means of treatments with EO were compared to control using the Dunnet test. To assess the effects of diets on *Salmonella* counts in the cecum and excreta over time, data was logarithmically transformed ($\log_{10}$ cfu/g) before analysis to achieve homogeneity of variance and analyzed with a repeated measures model (PROC MIXED procedure). Results indicating a zero bacterial count were set at the lowest detectable limit of 1 cfu/mL of sample. Differences among the means were detected at $P \leq 0.05$ using Tukey's test. Also, when differences were detectable, simple linear regression were building with time (days post infection) as the independent variable and levels of EO as the dependent variable and calculated using the REG procedure of SAS.

RESULTS AND DISCUSSION

Chemical Analysis of the Essential Oils

Initially we compared commercial acquired oils obtained from *T. vulgaris* and *O. gratissimum* to oil extracted from fresh aerial parts harvest from an experimental station. We observed that the GC-MS results showed a diversified profile of compounds in number and quantity for both in different season throughout the year and in commercial oils. In general, *T. vulgaris* (Table 1) showed a greater number of components than *O. gratissimum* (Table 2), with higher phenol monoterpenes contents than thyme and *p*-cymene as reported by Atti-Santos et al. (2004) and Whei, Shibamoto (2010). The amount of thymol from leaves harvest during the Winter was lower (54.42 %) than those from other seasons, around 60 % for Summer and Autumn, whereas, *p*-cymene were higher (24.11 % vs 15.10 % and 16.96 % respectively for Summer and Autumn). Commercial oil from *T. vulgaris* presents less thymol (22.64 %) and more carvacrol (25 %) than the average of those from the experimental station.

Table 1. Components of *T. vulgaris* oil commercially acquired or obtained from different harvests detected by gas chromatography and mass spectrometry analyses (relative percentage of the total peak area).

Constituents	*t _R (min)	Commercial	Summer	Autumn	Winter
α -thujene	5.79	0.12	0.47	0.65	0.86
α -pinene	6.00	4.13	0.28	0.33	0.54
1-octen-3-ol	6.17		0.78	0.98	1.32
camphene	6.40	2.81			0.42
myrcene	6.51		0.72	0.88	1.02
1,8-cineole	7.50				0.90
β -pinene	7.17	0.65			
β -mircene	7.55	1.61			
α -phellandrene	8.01	1.62			
δ -3-carene	8.19	0.45			
<i>d</i> -limonene	8.89	3.00			
(<i>E</i>)- <i>b</i> -ocimene	8.41				5.57
α -terpinene	8.41	0.48	0.67	0.70	0.70
<i>p</i> -cymene	8.66	21.35	15.10	16.96	24.11
γ -terpinene	8.95	1.06	7.43	6.63	0.66
eucalyptol	9.02	1.91			
terpinolene	10.98	1.09			
linalool	11.55	4.47	2.58	2.08	2.42
menthone	12.19			0.83	
camphor	13.29	0.24	1.45		
isoborneol	13.79	1.62			
borneol	14.20	3.14	0.65	0.88	1.34
terpinen-4-ol	14.64	1.26	0.85	0.69	0.83
α -terpineol	15.35	0.45			
methyl ester carvacrol	15.87			1.15	0.83
thymol	19.54	22.64	61.52	60.59	54.42
carvacrol	20.02	25.01	4.75	3.80	2.77
(<i>Z</i>)-caryophyllene	22.67				0.92
longifolene	24.08	0.50			
(<i>E</i>) caryophyllene	24.67	0.16	1.67	1.49	
γ -muurolene	25.49		0.50		
Not identified		0.20	0.60	1.40	0.40
Total components		23	16	15	17
Total (%)		100	100	100	100

* t_R(min)- retention time, minutes

Table 2. Components of *O. gratissimum* oil commercially acquired or obtained from different harvests detected by gas chromatography and mass spectrometry analyses (relative percentage of the total peak area).

Constituents	*t _R (min)	Commercial	Summer	Autumn	Winter
α -thujene	5.78	0.48		0.28	0.19
sabinene	6.09			0.23	
1-octen-3-ol	6.17			0.53	
myrcene	6.51	0.26		0.30	0.20
1,8-cineole	7.75			1.93	
(<i>E</i>)-ocimene	8.30		0.37	0.51	0.44
α -terpinene	8.39	0.16			
<i>p</i> -cymene	8.60	1.04			
γ -terpinene	8.68			0.37	0.27
(<i>Z</i>)-ocimene	9.10	2.36	7.58	13.57	12.46
<i>cis</i> -sabinene hydrate	10.26	0.20			
<i>trans</i> -sabinene hydrate	11.46	0.37			
allo-ocimene	12.55	1.08			
terpinen-4-ol	14.62	1.27		0.95	0.58
α -cubenene	21.76	0.31			
eugenol	22.16	68.87	80.40	70.45	78.94
α -copaene	22.99	2.56	0.88	1.09	0.72
(<i>E</i>)-caryophyllene	23.03		2.01	2.29	
β -bourbonene	23.34	1.02			
(<i>Z</i>)-caryophyllene	24.77	6.45			1.25
β -gurjunene	25.09	0.48			
γ -himachalene	25.68			0.49	
α -humulene	26.06	0.56			
(<i>E.e</i>)- α -farnesene	26.66		3.63		
γ -muurolene	27.03	1.36		5.74	4.34
germacrene-D	27.22	3.71			
α -muurolene	27.94	0.48	4.28		
δ -cadinene	28.48	2.79		0.49	0.43
γ -cadinene	28.87	0.76			
Not identified		3.40	0.80	0.80	0.20
Total components		21	7	15	11
Total (%)		100	100	100	100

* t_R(min)- retention time, minutes

In all samples, however, the sum of the two isomeric phenols (thymol + carvacrol) and their precursors constituted (*p*-cymene and α -pinene) (Poulouse; Crouteau, 1978; Consentino et al., 1999; Jerkovic et al., 2001) were predominant of each essential oil: 73.1 %, 81.7 %, 81.7 % and 81.8 % of the total oil, respectively for Commercial, Summer, Autumn and Winter. Jerkovic et al. (2001) also found fluctuations in the concentrations of thymol, carvacrol and *p*-cymene among same species harvested during different seasons and the sum of quantity of these constituents remained stable. Our data ratify that probably the range amount found is because they are part of a biosynthesis process and can vary their concentrations according to the level of maturity of the plant at the time of harvest.

Analyses of *O. gratissimum* indicate predominated amount of phenylpropanoid eugenol in all samples as reported in the literature (Simon et al, 1999; Vasconcelos Silva et al., 1999; Vieira et al., 2001; Freire et al., 2006). Commercial sample contained 68.87 % of eugenol, closer to Autumn level (70.45 %), but in lesser amount than in Summer (80.4 %) and Winter (78.94 %). However, the number of compounds (21) presented in the Commercial oil was up to 7, 15 and 11 observed in oil samples collected in Summer, Autumn and Winter, respectively. These findings clearly support that differences in the biochemical profile are determined by the harvest season and could increase with influences such as daytime, geographic region, parts of plants used and environmental conditions in which they are grown (Vasconcelos Silva et al., 1999; Jerkovic et al., 2001; Freire et al., 2006; Celiktaş et al., 2007; Changa et al., 2008; Hussain et al., 2008).

Minimum Inhibitory Concentration

As a next step we study the minimal inhibitory concentration (MIC) of pure EO and its combination on the grown of different strain of *S. Enteritidis* (Table 3). We could observe the effect of the season and also each strain behaves in a different way. In general, the results suggest that all treatments had antibacterial activities against the five tested *S. Enteritidis* strains. However, there are large ranges of results with 300 µg/mL of *T. vulgaris* harvest during the Autumn controlled very well *Salmonella*, while *O. gratissimum* also harvest during the Autumn showed an inhibitory activity at the level of 1300 µg/mL. Overall, essential oil from *T. vulgaris* could inhibited better the *S. Enteritidis* strains than that from *O. gratissimum*.

Table 3. Minimum inhibitory concentration (MIC, $\mu\text{g.mL}^{-1}$) of pure and blend of the essential oils from different season and commercial (com) against five different strains of *Salmonella* Enteritidis

S. Enteritidis	<i>Thymus vulgaris</i>				<i>Ocimum gratissimum</i>				Blend 1:3 ¹				
	Com	Summer	Aut.	Winter	Com	Summer	Aut.	Winter	Com	Summer	Aut.	Winter	Std ²
Z1 043 (85)	900	500	400	500	1200	600	1000	900	700	500	1000	1000	N.A*
Z1 001 (86)	900	500	300	500	1100	600	1000	900	800	1000	900	900	1000
Z1 005 (87)	800	500	400	500	600	600	1000	900	700	500	1000	900	N.A
3065/89-2 (88)	900	600	800	500	800	600	1300	1000	700	1000	1000	1000	N.A
Z1 025 (89)	700	500	800	500	1000	900	900	1000	700	1000	800	1000	1000

¹ Blend in a proportion of 1 part of *Thymus vulgaris* and 3 parts of *Ocimum gratissimum* (w:w).

² Standard with pure compounds of thymol (1 part) and eugenol (3 parts).

* Not analyzed.

Despite that, based on our previous observations, leaves from *O. gratissimum* produce more oils (higher yield) than leaves from *T. vulgaris* (Sartorato et al., 2004) and we decided to test a mix for these oils considering the largest proportion of *O. gratissimum*.

The combination of 1 part of *T. vulgaris* and 3 parts of *O. gratissimum* was generally efficient to inhibit *S. Enteritidis*. However, this study shows no benefits blending essential oils of *T. vulgaris* and *O. gratissimum* collected from CMAP for different seasons. On the other hand, the Commercial oil sample presented homogeneous results, broadest spectrum of action among the five *S. Enteritidis* serotypes and it was even better than a mix of standard thymol and eugenol (1:3), the highest compounds present in these oils. The extension of the effect caused by the same plant and the same serovar *Enteritidis* strongly suggest that is pretty difficult to establish a single MIC value for one product. Indeed, the literature itself is quite variable with MIC reference for *Salmonella ssp.* mostly for *Thymus* oil (Burt, 2004; Bajpai et al., 2012). More often than not, *in vitro* studies prove that phenol derivatives from essential oils such as thymol, carvacrol and eugenol taking action as potent antimicrobial properties against foodborne pathogens like *Salmonella* (Consentino et al., 1999; Dorman; Deans, 2000; Olasupo et al., 2003; Si et al., 2006; Zhou et al., 2007; Devi et al., 2010; Hoffman-Pennesi; Wu, 2010; Kollanoor Johny et al., 2010). Recently, Chauhan; Kang, (2014) have shown that rupture of membrane integrity is the main mechanism of action of thymol against *S. Typhimurium*. Investigations have reported that it is still unclear if certain unique active components are responsible for actions or if the effects are due to multiple components presented in entire oils. Consentino et al. (1999) and Hoffman-Pennesi; Wu (2010) testified that the single thymol molecule was stronger than thyme oil to inhibit different strains of *Salmonella*. However, Burt (2004) pointed out that minor components and its combinations seems to have a critical play in antibacterial activity promoting a synergistic effect. Indeed, the synergistic effect is already demonstrated for thymol and carvacrol (Lambert et al., 2001; Vardar-Ünlü, et al., 2003; Zhou et al., 2007), carvacrol and cymene (Ultee et al., 2002), thymol/carvacrol and eugenol (Pei et al., 2009) or EO blend (Fu et al., 2007; Thanissery et al., 2014), probably due the combined and interactive antibacterial mechanism of these chemical compounds that affect multiple biochemical processes in the bacteria (Lambert et al., 2001, Di Pasqua et al., 2006; Devi et al., 2010).

The present results lead us to hypothesize that there are a synergistic effect of the blend of Commercial EO improving the antibacterial activity with a good relation of cost-effectiveness, become a viable option to be adopted in subsequent assays. These oils are available in the market for aromatherapy and were not used in poultry diets to control

Salmonella. Therefore, we decided to quantify their major components to standardization of the product based on thymol, carvacrol and eugenol. The analyses of CG-MS showed 48 % of eugenol content for *O. gratissimum*, 21 % and 26 % of thymol and carvacrol, respectively, for *T. vulgaris*. Finally, the MIC level of 700 µg/mL at the proportion of 1:3, characterized by 1 part of thymol plus carvacrol and 3 parts of eugenol was chosen to be our product and defined as essential oil blend (EOB).

In vitro* Growth Rate of *S. Enteritidis

In order to assess the bactericidal effect of sublevels concentrations of EOB over time, growing curves were plotted. We considered as sublevels 70 µg/mL and 140 µg/mL, i.e. 10 % and 20 % based on the 700 µg/mL, the value established in the MIC assay. Before to perform the *in vitro* growth rate assay, we randomized selected a *Salmonella* strain and induce it to rifampicin resistance (*S. Enteritidis* MB089-R). The kinetics curves for *S. Enteritidis* MB089-R strain in LB broth at various concentrations of EOB are shown in Fig. 1. The growth curves showed similar patterns, except for the level of 700 µg/mL (no growth detected). In general, lag phase consisted from 0 to 3 h of incubation time, exponential phase from 3 to 8 h of incubation time and after the stationary phase. Also, Lee et al. (2002) investigated a growth of strains of *S. Enteritidis* and *S. Typhimurium* in a liquid medium and found related results for both; where the exponential phase started at 2 up to 6 h. The doubling time of *S. Enteritidis* MB089-R incubated with EOB concentrations showed a significant reduction in bacterial growth during the exponential phase comparing with Control group (without EOB) ($p < 0.05$). The Control groups expressed your doubling time (T_d) as 29.9 min and growth were not completely suppressed at concentrations of 70 µg/mL ($T_d = 40.7$ min) and 140 µg/mL ($T_d = 46.5$ min) whereas the level of 700 µg/mL could completely inhibit *Salmonella* growth. The growth rate performances of sublevels were, however, less substantial, although has delayed the cell of *Salmonella* duplicate in, average, 11 and 17 min, respectively, for 70 and 140 µg/mL. These results show that the presence of different levels of EOB in *Salmonella* liquid medium played an important antimicrobial activity encouraging us to verify the effects in the gut of broilers.

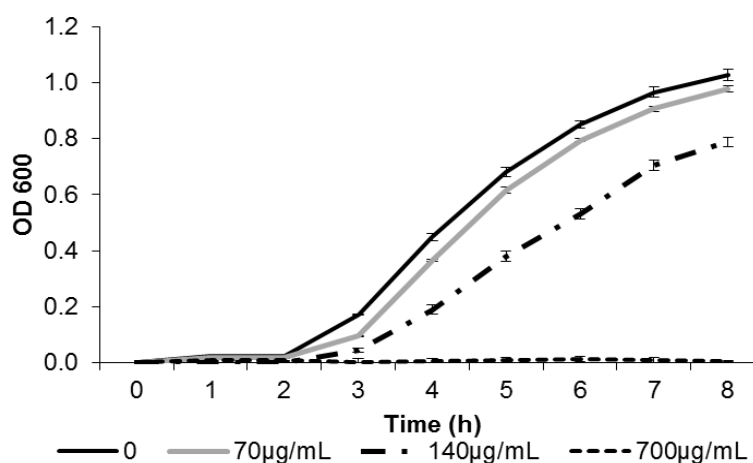


FIG 1. Growth of *S. Enteritidis* MB089-R in LB in the presence of different concentrations of EOB at 37°C with shaking. Treatments means: 0 µg/mL (Control); 70 µg/mL (EOB70); 140 µg/mL (EOB140) and 700 µg/mL (EOB700). All data are means of quadruplicate measurements. Vertical bars indicate the standard deviation.

Growth Performance of Broilers

The performance assay with inclusion levels of microencapsulated EOB in diets of broilers were conducted owing to positive *in vitro* results. The same levels adopted in the *in vitro* growth assay were used, but in a microencapsulated form, expressed as ppm of EOB in the diets. We decided to microencapsulate the EOB to be easily included in the diet and for preservation of the volatile compounds, increasing their shelf life (Gharsallaoui et al., 2007). Thus, this trial primary objective was to detect the acceptability of the diets containing the oils because we were concerned that high level of EOB could negatively affect performance. The results suggest that there are no detrimental impacts on broilers performance fed with distinct levels of EOB in diets ($p > 0.05$) (Table 4). Different experimental approaches have demonstrated a controversial effect when birds were fed with essential oils, herbal extracts or specific compounds. Bolukbaşı et al. (2006) and Al-Kassie (2009) found significant improvements on growth performance in broilers fed 200 ppm of thyme oil in diets whereas Najafi; Torki (2010) evaluating the same inclusion did not achieve any results. Cross et al. (2003) and Toghyani et al. (2010) also had discovered that high levels (up to 5000 ppm) could be used in diets without losses of performance in chickens during all experimental period, although a decrease of feed intake was observed in the first 15 days (Cross et al., 2003). There are no reports on the use of *O. gratissimum* essential oil in the diets of broiler chickens and their performance effects. Blend of pure compounds of EO as eugenol and

mainly thymol are reported in the literature by Lee et al. (2003); Hernandez et al. (2004); Cross et al. (2007); Tiihonen et al. (2010); Amerah et al. (2012) and Khattak et al. (2014) with questionable positive effects on performance and digestibility of broilers. We were in agreement with most of them when suggesting that trials conducted at ideal conditions of experimentation could affect the degree of growth promotion changing the needs of broilers. With these results, we proceed to the *Salmonella* challenge test, since the levels in the diet of microencapsulated EOB did not affect the feed consumption by the birds.

Table 4. Effect of EOB supplementation on body weight, weight gain, feed intake and feed conversion ratio (Feed:gain) from 1 to 21-day-old broilers¹.

	Period	Control	EOB70	EOB140	EOB700	SEM*	P-value
Body weight (g)	7 d	197	206	195	200	3.1	0.126
	21 d	999	1014	993	1010	12.9	0.646
Weight gain (g)	1 to 7 d	147	155	144	150	3.2	0.121
	7 to 21 d	801	808	798	809	11.8	0.889
	1 a 21 d	948	964	942	959	13.0	0.644
Feed intake (g)	1 to 7 d	168	170	162	168	4.0	0.564
	7 to 21 d	1133	1108	1121	1141	16.4	0.593
	1 a 21 d	1301	1278	1283	1310	18.1	0.586
Feed:gain (g:g)	1 to 7 d	1.14	1.09	1.13	1.12	0.01	0.091
	7 to 21 d	1.41	1.37	1.40	1.41	0.02	0.439
	1 a 21 d	1.37	1.33	1.36	1.37	0.02	0.284

¹Birds were fed with a standard diet supplemented or not with microencapsulated EOB expressed as: 0 ppm (Control); 70 ppm (EOB70); 140 ppm (EOB140) and 700 ppm (EOB700). All data are means of four replicates per treatment (24 birds/treatment). *SEM: Standart Error of Mean.

Salmonella Colonization and Persistence in Chickens

Results of the cecal and fecal bacterial counts of *Salmonella* over time and if the levels of EOB inhibited this pathogen are reported in Table 5. Birds were certified to absence of *Salmonella* on the housing and the inoculum containing 10^6 CFU mL⁻¹ of *S. Enteritidis* MB089-R was given (0.1 mL per chicks) at 2 day of age. The behave of the *Salmonella* in the cecal and excretas through the experimental period increasing the number after inoculation with the pick at 9 days post inoculation (p.i.) followed by the decline ($p < 0.05$). After 3 and 9 d p.i., the *Salmonella* colonization found in the cecal content (5.94 and 6.22) was higher than those in fecal excretion (3.05 and 5.23) and the opposite has happened at 23 d p.i. (2.91 vs 3.83), but at a not so high level for both as observed at 9 d p.i.. Barrow et al. (1988) and

Desmith et al. (1998a) showed that fecal excretion of birds infected with *S. Hadar* at 1 day-old stayed high until several weeks p.i. that is not so with regard to *S. Thyphimurium* that is excreted for a shorter time. More invasive serotypes as *Thyphimurium* and *Enteritidis* seem to induce a greater immune response, which could itself lead to reduce fecal shedding (Barrow et al., 1988) as found in our experiment.

At 3 days p.i. chickens from all treatments were positive to *Salmonella* expressing no differences with the EOB supplementation, even though the higher level (EOB700) inhibited, in average, 1 log comparing to the Control treatment in ceca and fecal excretion. Decreased colonization at this early point after infection will lead to a decrease in contamination of the environment and as a consequence to a reduction in infection pressure. In the ninth day p.i, the sampling day where we observe the higher cecal (6.22) and fecal excreta (5.23) presence of *Salmonella*, the inclusion of EOB in the diets were efficient to control the pathogen and showed a linear regression ($p < 0.05$) (Fig. 2 and Fig. 3). In the Control group, chickens had more than 10^7 cfu/g and 10^6 cfu/g *Salmonella* in their ceca and excreta, respectively, while the level of 700 ppm of EOB reduced to 10^5 cfu/g and 10^3 cfu/g. Overall period showed an effective *Salmonella* depletion in fecal excretion from broilers fed EOB ($p < 0.05$) (Fig. 4), when each level decreased 1.0; 1.5 and 1.9 $\log_{10}$ cfu/g, respectively, in comparison with Control group.

Table 5. *Salmonella* counts (log₁₀ CFU/g) in samples of cecal and fecal material over the experimental period by treatment ¹

Days post infection	0	EOB70	EOB140	EOB700	Days average
<i>Salmonella</i> , log ₁₀ , CFU, g ceco					
3	6.22 ± 0.53	6.41 ± 0.55	5.82 ± 0.32	5.29 ± 0.24	5.94 ± 0.41 ^A
9	7.59 ± 0.34 ^a	6.21 ± 0.80 ^{ab}	5.81 ± 0.10 ^{ab}	5.25 ± 0.18 ^b	6.22 ± 0.34 ^A
23	3.20 ± 1.20	2.90 ± 0.90	2.89 ± 0.89	2.67 ± 0.67	2.91 ± 0.91 ^B
Levels average ²	5.67 ± 0.69	5.18 ± 0.75	4.84 ± 0.41	4.40 ± 0.36	
<i>Salmonella</i> , log ₁₀ , CFU, g fecal excretion					
3	3.85 ± 0.93	2.88 ± 0.88	2.87 ± 0.87	2.61 ± 0.61	3.05 ± 0.82 ^B
9	6.80 ± 0.14 ^a	5.45 ± 0.96 ^{ab}	4.95 ± 0.21 ^{ab}	3.74 ± 1.07 ^b	5.23 ± 0.41 ^A
23	4.69 ± 0.19	4.45 ± 0.48	3.03 ± 1.03	3.16 ± 1.17	3.83 ± 0.41 ^B
Levels average ³	5.11 ± 0.42 ^a	4.26 ± 0.78 ^{ab}	3.62 ± 0.70 ^{ab}	3.17 ± 0.95 ^b	

¹Bacterial count data, n = 3 for all treatments. Each value represents the average ± standard error.

¹Birds were fed with a standard diet supplemented or not with microencapsulated EOB expressed as: 0 ppm (Control); 70 ppm (EOB70); 140 ppm (EOB140) and 700 ppm (EOB700).

²Cecal counts (*P*treatment: 0.132; *P*day: < 0.001; *P*treatment*day: 0.792), ³Fecal counts (*P*treatment: < 0.05; *P*day: < 0.001; *P*treatment*day: 0.873).

a,b Means within a row lacking a common superscript are significantly different (Tukey test, *p* < 0.05). A,B Means within a column lacking a common superscript are significantly different (Tukey test, *p* < 0.05).

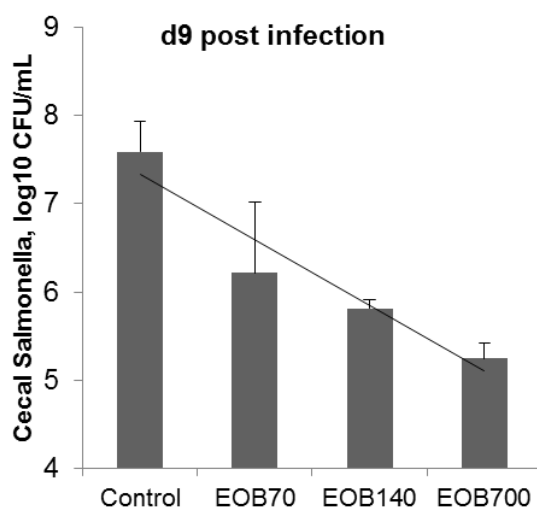


FIG 2. Cecal *S. Enteritidis* MB089-R at 9 days post infection. Birds were fed with a standard diet supplemented or not with microencapsulated EOB expressed as: 0 ppm (Control); 70 ppm (EOB70); 140 ppm (EOB140) and 700 ppm (EOB700). All data are means of triplicate measurements. Vertical bars indicate the standard error.

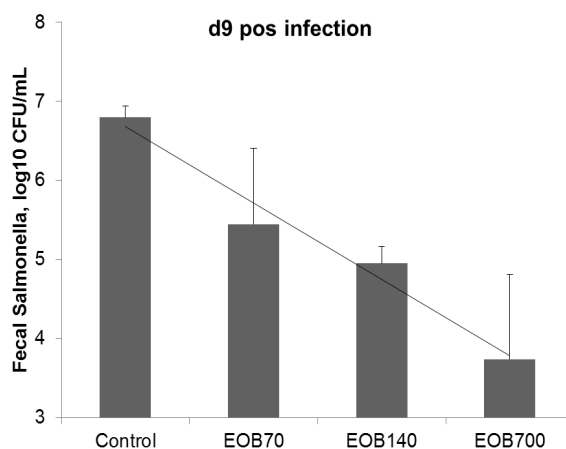


FIG 3. Fecal excretion *S. Enteritidis* MB089-R at 9 days post infection. Birds were fed with a standard diet supplemented or not with microencapsulated EOB expressed as: 0 ppm (Control); 70 ppm (EOB70); 140 ppm (EOB140) and 700 ppm (EOB700). All data are means of triplicate measurements. Vertical bars indicate the standard error.

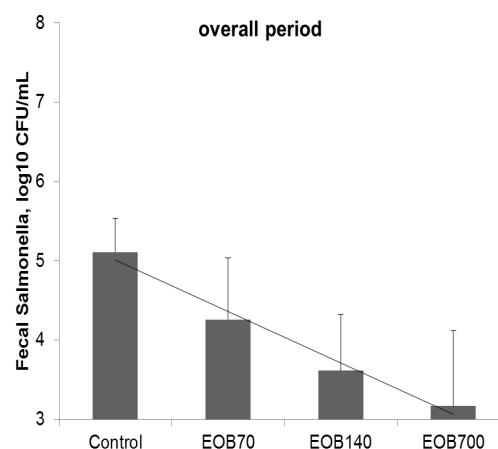


FIG 4. Fecal excretion *S. Enteritidis* MB089-R in overall period. Birds were fed with a standard diet supplemented or not with microencapsulated EOB expressed as: 0 ppm (Control); 70 ppm (EOB70); 140 ppm (EOB140) and 700 ppm (EOB700). All data are means of triplicate measurements. Vertical bars indicate the standard error.

Essential oils and their constituents have been used for recent years in poultry diet to control *Salmonella*. Positive effects were observed mixing molecules as eugenol plus trans-cinnamaldehyde (Kollanoor-Johny et al., 2012 a, b) and thymol plus cinnamaldehyde (Amerah et al., 2012; Cerisuelo et al., 2014). Thymol, carvacrol and eugenol are the mainly compounds of the EOB from *T. vulgaris* and *O. gratissimum* used in our study and there are no *in vivo* reports with this blend against *Salmonella*, especially in a microencapsulated form. The mode of action of these molecules are largely showed *in vitro*, due their hydrophobic feature and the presence of free hydroxyl group allowing hydrogen bonding, which affects pH and ionic balance damaging the cell membrane permeability of the bacterium (Di Pasqua et al., 2006; Devi et al., 2010, Chauhan; Kang, 2014). Thus, for this mechanism of action to prove, it would be necessary to contact the essential oil with *Samonella*, which may occur if the molecule reaches the cecum of birds, since that ceca are the predominant site for *Salmonella* colonization (Desmidt et al., 1997, 1998b). However, how and if the constituents of the EO remain in the gastrointestinal gut of broilers to act against *Salmonella* is still unclear. According to Kohlert et al. (2000), most active principles of plant extract are absorbed in the intestine by enterocytes, and readily metabolized by the body. Alali et al. (2013) suggest that EO blend (carvacrol, thymol, eucalyptol, lemon, and citric acid) effect on *S. Heidelberg* in the crop and not in the ceca of inoculated chickens. In pigs, Michiels et al. (2008) found that carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde were almost

completely absorbed in the stomach and proximal intestine after oral ingestion. Regardless of, Haselmeyer et al (2015) evaluated at increasing levels (0.1, 0.2, 0.3 and 1.0 % w: w) inclusion of thyme (leaves and flowers powder containing 1.4 % of EO with 58 % of thymol) in the diet of broiler for 35 days. The authors detected thymol molecule in the gut and plasma content, which the group that received 1 % of thyme in the diet showed higher concentrations of thymol than the other groups. Likewise, in the present study the microencapsulation of EOB may be a protective way to reach the target into the intestinal environment, controlling the *S. Enterica* colonization as observed with the high EOB treatment (EOB700). It is in this context that the research conducted by Zhang et al. (2014) support our results. The authors investigated the effect of absorption of carvacrol molecule encapsulated or not with sodium alginate and wheat protein formulations, with similar features than maltodextrin, delivered via oral gavage in broilers. The group concluded that a negligible amount of unencapsulated carvacrol was present in the gut of birds, but microparticles of optimum formulation remitted a significant higher concentration of carvacrol to the jejunum and ileum regions, including colon. Another assumption would be regarding modulating action of essential oils and the increase of beneficial bacterias in the gut. There are still poor evidences on the influence of these oils on beneficial members of the intestinal microbiota such as *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus* spp., wich could be another way to defuse the *Salmonella* colonization (Si et al., 2006; Cross et al., 2007; Ouwehand et al., 2010) highlighting that this area needs more investigations.

At the end of experimental period, all remain birds were weighted, culled and liver removed (Table 6). Supplementation of poultry inoculated with 10^5 UFC⁻¹ of *Salmonella* and feed with microencapsulated EOB had no significant effect on live weight compared to Control groups, included uninoculated one ($p > 0.05$). Kollanoor-Johny et al. (2012 a) found a reduction on the feed intake, but not in the body weight of broilers inoculated with 10^8 UFC⁻¹ of a mix of *Salmonella* Enterica. Data on the effects of colonization of *Salmonella* on performance in chickens challenged and untreated are lacking. Despite some studies suggest that *Salmonella* not affect performance of broilers, Remus et al. (2014) conducted a meta-analysis and revealed that broilers infected with *Salmonella* spp. exhibited a 9 % reduction in their feed intake and a 29 % reduction in their growth rate. The decrease of feed intake could be related with damage to the intestinal mucosa due an early colonization of the pathogen in the gut (Desmith et al., 1998 b). This fact was not observed in our study, nor was there any mortality register.

Although no significant differences were detected to relative weight of liver ($p > 0.05$), the numbers show an increase of, mostly for high level of EOB. The *Salmonella* contamination could swell the liver (Rahman et al., 2004; Saha et al., 2012), in addition there are evidence of hepatoprotective action of thyme oil (Deans et al., 1993) and molecules of thymol (Janbaz, et al., 2003) and eugenol (Nagababu et al., 1995). Our results corroborate with Lee et al. (2004) that evaluated the addition of 200 ppm of thymol and, on the other hand, disagree with the data presented by Bölükbaşı et al. (2006) that found an increase of liver weight of birds on the control group compared to treatment with thyme oil.

Table 6. Effect of EOB supplementation on live weight and relative weight of liver at 24-day-old broilers¹.

Treatment groups ¹	<i>S. Enteritidis</i> infection	Live weight, g	Relative weight of liver ² , %
Negative control	no	965	2.78
Positive control	yes	974	3.03
EOB70	yes	930	3.05
EOB140	yes	935	3.08
EOB700	yes	1001	3.19
P- value		0.669	0.077
SEM		16.5	0.05

¹Birds were fed with a standard diet supplemented or not with microencapsulated EOB expressed as: 0 ppm (Negative and Positive Controls); 70 ppm (EOB70); 140 ppm (EOB140) and 700 ppm (EOB700). All data are means of seven replicates per treatment. Means of treatments with EOB were compared to Negative control using the Dunnet test and statistical significance was declared at $p < 0.05$. *SEM: Standart Error of Mean.

² Relative weight of liver = (weight of liver (g) / live weight (g)) x 100.

CONCLUSION

In summary, we effectively developed a product based on EO from *T. vulgaris* and *O. gratissimum* to control *Salmonella enterica* serovar Enteritidis in broilers. Supplementation broiler feed with 700 ppm of the essential oil blend represented for 1 part of thymol plus carvacrol and 3 parts of eugenol did not affect bird performance and offered some protection of chickens against *Salmonella* colonization.

REFERENCES

- ADAMS, R. P. Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. **Allured: Carol Stream, IL**, 2001.

- ALALI, W. Q. et al. Effect of essential oil compound on shedding and colonization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in broilers. **Poultry science**, v. 92, n. 3, p. 836-841, 2013.
- AL-KASSIE, GHALIB AM et al. Influence of two plant extracts derived from thyme and cinnamon on broiler performance. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 29, n. 4, p. 169-173, 2009.
- AMERAH, A. M.; MATHIS, G.; HOFACRE, C. L. Effect of xylanase and a blend of essential oils on performance and *Salmonella* colonization of broiler chickens challenged with *Salmonella* Heidelberg. **Poultry science**, v. 91, n. 4, p. 943-947, 2012.
- ATTI-SANTOS, A. C. et al. Seasonal variation of essential oil yield and composition of *Thymus vulgaris* L.(Lamiaceae) from South Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 4, p. 294-295, 2004.
- BAJPAI, Vivek K.; BAEK, Kwang-Hyun; KANG, Sun Chul. Control of *Salmonella* in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 722-734, 2012.
- BAKKALI, F, et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BARROW, P. A.; SIMPSON, Joan M.; LOVELL, Margaret A. Intestinal colonisation in the chicken by food poisoning *salmonella* serotypes; Microbial characteristics associated with faecal excretion. **Avian Pathology**, v. 17, n. 3, p. 571-588, 1988.
- BASER, K. Husnu Can; BUCHBAUER, Gerhard (Ed.). Handbook of essential oils: science, technology, and applications. CRC Press, 2015.
- BEN ARFA, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149-154, 2006.
- BOLUKBASI, S. C.; ERHAN, M. K.; OZKAN, A. Effect of dietary thyme oil and vitamin E on growth, lipid oxidation, meat fatty acid composition and serum lipoproteins of broilers. **South African Journal of Animal Science**, v. 36, n. 3, p. 189-196, 2006.
- BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

- BUSATTA, C. et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food microbiology**, v. 25, n. 1, p. 207-211, 2008.
- CELIK TAS, O. Yesil et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553-559, 2007.
- CERISUELO, A. et al. The impact of a specific blend of essential oil components and sodium butyrate in feed on growth performance and *Salmonella* counts in experimentally challenged broilers. **Poultry science**, v. 93, n. 3, p. 599-606, 2014.
- CLSI, 2012. Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição. Download in 14 de fevereiro de 2014.
- CHANG, Xianmin; ALDERSON, Peter G.; WRIGHT, Charles J. Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1, p. 216-223, 2008.
- CHAUHAN, Anil Kumar; KANG, Sun Chul. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* ser. typhimurium *in vitro* and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. **Research in microbiology**, v. 165, n. 7, p. 559-565, 2014.
- CONSENTINO, S. et al. In vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in applied microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130-135, 1999.
- CROSS, D. E. et al. The performance of chickens fed diets with and without thyme oil and enzymes. **British Poultry Science**, v. 44, n. S1, p. 18-19, 2003.
- CROSS, D. E. et al. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. **British poultry science**, v. 48, n. 4, p. 496-506, 2007.
- DEANS, S.G.; et al. Promotional effects of plant volatile oils on the polyunsaturated fatty acid status during aging. **Journal Essential Oil Research**, v. 16, p.71–74, 1993.

- DESMIDT, Miek; DUCATELLE, Richard; HAESBROUCK, Freddy. Pathogenesis of Salmonella enteritidis phage type four after experimental infection of young chickens. **Veterinary microbiology**, v. 56, n. 1-2, p. 99-109, 1997.
- DESMIDT, Miek; DUCATELLE, Richard; HAESBROUCK, Freddy. Serological and bacteriological observations on experimental infection with Salmonella hadar in chickens. **Veterinary microbiology**, v. 60, n. 2, p. 259-269, 1998 a.
- DESMIDT, Maria; DUCATELLE, Richard; HAESBROUCK, Freddy. Research notes: Immunohistochemical observations in the ceca of chickens infected with Salmonella enteritidis phage type four. **Poultry science**, v. 77, n. 1, p. 73-74, 1998 b.
- DEVI, K.P., et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against Salmonella typhi by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107–115, 2010.
- DI PASQUA, Rosangela et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, 2006.
- DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p.308– 316, 2000.
- DUARTE, Marta Cristina Teixeira et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on Escherichia coli. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.
- FISCHER, Karl. A new method for the analytical determination of the water content of liquids and solids. **Angew. Chem**, v. 48, n. 394, p. 24, 1935.
- FU, YuJie et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 10, p. 989-994, 2007.
- GHARSALLAOUI, Adem et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

- HASELMEYER, Alexander; ZENTEK, Jürgen; CHIZZOLA, Remigius. Effects of thyme as a feed additive in broiler chickens on thymol in gut contents, blood plasma, liver and muscle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 3, p. 504-508, 2015.
- HERNANDEZ, F. et al. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. **Poultry science**, v. 83, n. 2, p. 169-174, 2004.
- HOFFMAN-PENNESI, D.; WU, C. The effect of thymol and thyme oil feed supplementation on growth performance, serum antioxidant levels, and cecal Salmonella population in broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 19(4), p. 432-443, 2010.
- HUDAIB, Mohammad et al. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 29, n. 4, p. 691-700, 2002.
- HUSSAIN, Abdullah Ijaz et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food chemistry**, v. 108, n. 3, p. 986-995, 2008.
- JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. Hepatoprotective effect of thymol on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. **Pak J Biol Sci**, v. 6, n. 5, p. 448-451, 2003.
- JERKOVIĆ, Igor; MASTELIĆ, Josip; MILOŠ, Mladen. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. **International journal of food science & technology**, v. 36, n. 6, p. 649-654, 2001.
- KHATTAK, F. et al. Effects of natural blend of essential oil on growth performance, blood biochemistry, cecal morphology, and carcass quality of broiler chickens. **Poultry science**, v. 93, n. 1, p. 132-137, 2014.
- KOHLERT, C. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. **Planta medica**, v. 66, n. 06, p. 495-505, 2000.
- KOLLANOOR JOHNY, A., et al. Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol and thymol on *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents *in vitro*. **Journal Applied Poultry Research**, v.19, p. 237–244, 2010.

- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. *Journal of applied microbiology*, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.
- LEE, E. N. et al. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**, v. 81, n. 5, p. 632-641, 2002.
- LEE, K.-W. et al. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **British poultry science**, v. 44, n. 3, p. 450-457, 2003.
- LEE, K. W. et al. Cinnamaldehyde, but not thymol, counteracts the carboxymethyl cellulose-induced growth depression in female broiler chickens. **Int. J. Poult. Sci**, v. 3, n. 9, p. 608-612, 2004.
- LEE, S.J.; et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, p. 131-137, 2005.
- MICHIELS, Joris et al. *In vitro* degradation and *in vivo* passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans- α -cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 13, p. 2371-2381, 2008.
- NAGABABU, E.; SESIKERAN, B.; LAKSHMAIAH, N. The protective effects of eugenol on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. **Free radical research**, v. 23, n. 6, p. 617-627, 1995.
- NAJAFI, P.; TORKI, M. Performance, blood metabolites and immunocompetence of broiler chicks fed diets included essential oils of medicinal herbs. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 7, p. 1164-1168, 2010.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient Requirements of Poultry. Washington, D.C. 1994. 155p.
- OLASUPO, N. A. et al. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 448-451, 2003.

- OUWEHAND, A. C. et al. *In vitro* effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. **Veterinarni Medicina**, v. 55, n. 2, p. 71-78, 2010.
- PEI, Rui□song et al. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of food science**, v. 74, n. 7, 2009.
- POULOSE, A. J.; CROTEAU, Rodney. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 187, n. 2, p. 307-314, 1978.
- RAHMAN, M. A. et al. Bacterio-pathological studies on salmonellosis, colibacillosis and pasteurellosis in natural and experimental infections in chickens. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2004.
- REMUS, A. et al. A meta-analysis of the feed intake and growth performance of broiler chickens challenged by bacteria. **Poultry science**, v. 93, n. 5, p. 1149-1158, 2014.
- RODRIGUES, R.A.F. (2004). Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por spray drying, contendo extrato de café crioucentrado. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- ROMANE, Abderrahmane; HARRAK, Rajae; BAHRI, Fouad. Use thyme essential oils for the prevention of salmonellosis. In: *Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathogen*. InTech, 2012.
- SACCHETTI, Gianni et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.
- SAHA, A. K. et al. Salmonellosis in layer chickens: pathological features and isolation of bacteria from ovaries and inner content of laid eggs. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 10, n. 1, p. 61-67, 2012.
- SARTORATO A., et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p.273-280, 2004.

- SI, W. et al. *In vitro* assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde towards Salmonella serotype Typhimurium DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 6, p. 1282-1291, 2006.
- SIMON, James E. et al. Basil: a source of essential oils. **Advances in new crops**, p. 484-489, 1999.
- THANISSERY, R.; KATHARIOU S.; SMITH D. P. Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit Salmonella and Campylobacter *in vitro*. **Journal Applied Poultry Research**, v. 23, p. 221-227, 2014.
- TIIHONEN, Kirsti et al. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. **British poultry science**, v. 51, n. 3, p. 381-392, 2010.
- TOGHYANI, Majid et al. Performance, immunity, serum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 40, p. 6819-6825, 2010.
- VARDAR-ÜNLÜ, Gülhan et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of Thymus pectinatus Fisch. et Mey. Var. pectinatus (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 63-67, 2003.
- VASCONCELOS SILVA, M. G. et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of Ocimum gratissimum leaves. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 32-34, 1999.
- VIEIRA, R. F; et al. Genetic diversity of Ocimum gratissimum L. based on oil volatile constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 287-304, 2001.
- WIDDEL, F., 2010. Theory and Measurement of Bacterial Growth. Available in <
https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/31475166/Baterial_growth_01.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1502830074&Signature=k1KyAXCV6DZtRrHzS%2Bv8Uw6IAYk%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DBaterial_growth_01.pdf>. Download in: may, 17th, 2015.
- WEI, A; SHIBAMOTO, T. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p. 7218-7225, 2010.

WHO. Word Health Organization. Estimates of the global burden of foodborne diseases, 2010.

Disponível em:

https://extranet.who.int/sree/Reports?op=vs&path=/WHO_HQ_Reports/G36/PROD/EXT/FoodborneDiseaseBurden. Acesso em: 22 de setembro, 2016.

WHO. Word Health Organization. Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/situationanalysis/en/>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2017.

ZHANG, Y. et al. Alginate-whey protein dry powder optimized for target delivery of essential oils to the intestine of chickens. **Poultry science**, p. PS3843, 2014.

ZHOU, Feng et al. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Safety**, v. 27, n. 2, p. 124-133, 2007.

- CAPÍTULO 4 -

**MICROPARTICULAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS INIBINDO A OXIDAÇÃO
LIPÍDICA EM ALMÔNDEGAS DE FRANGOS: ESTUDOS *IN SITU* E *IN VIVO*.**

Micropartícula antioxidante e seus usos¹

DUARTE, Marta Cristina Teixeira; FIGUEIREDO, Adriana Nogueira; DUARTE, Renata Maria Teixeira; RODRIGUES, Rodney A. Ferreira; RACANICCI, Aline M. Calil

¹**Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: INPI BR 1020160203287. 02/09/2016.**

RESUMO

Atualmente, os antioxidantes naturais estão recebendo considerável atenção na nutrição humana e animal devido à sua associação com eficiência e segurança alimentar. Com o objetivo de explorar o uso de óleos essenciais foi avaliada a atividade antioxidante de uma blenda (BOE) de *Thymus vulgaris* e *Ocimum gratissimum* (1: 3) em diferentes níveis na alimentação de frangos de corte e de incorporação na massa cárnea. A BOE foi quantificada por cromatografia gasosa e espectrometria de massa sendo caracterizada por 1 parte de timol+carvacrol e 3 partes de eugenol e depois microencapsulada (20% óleo + 80% maltodextrina). Os diferentes níveis de inclusão da BOE (0, 70, 140 e 700 ppm) na forma microencapsulada e também o controle negativo (150 ppm de etoxiquim) não afetaram o consumo de ração das aves e também o pH do peito e da sobrecoxa, que foram retirados para avaliação dos produtos secundários de oxidação lipídica (TBARS) em almôndegas pré-cozidas. Além disso, 0, 150 ppm de BHT, 70 e 140 ppm de BOE microencapsulado foi misturado diretamente na massa cárnea de peito e de sobrecoxa das aves pertencentes ao grupo sem adição de aditivos antioxidantes. Em geral, as almôndegas de carne de frangos provenientes dos grupos suplementados apresentaram valores de TBARS inferiores aos do grupo sem aditivos antioxidantes, sendo este efeito mais pronunciado na carne de sobrecoxa. O maior nível de inclusão (700 ppm) apresentou os melhores resultados na prevenção da oxidação lipídica das almôndegas refrigeradas. Para o ensaio na matriz de carne, a adição de ambos, BHT e OE, foram eficientes para prevenir a oxidação lipídica em amostras pré-cozidas do peito quando comparadas com o grupo controle e, na carne de sobrecoxa, o nível de 140 ppm de OE atuou de forma ainda mais eficaz do que o antioxidante sintético. Concluiu-se que a BOE de *T. vulgaris* e *O. gratissimum* na forma microencapsulada foi eficaz no controle de processos oxidativos, tanto na dieta de frangos de corte como na formulação de produtos cárneos.

ABSTRACT

Nowadays, natural antioxidants are receiving considerable attention in human and animal nutrition due to their association with efficiency and food safety. With the objective of exploring the use of essential oils, we evaluated the antioxidant activity of a blend (EOB) of *Thymus vulgaris* and *Ocimum gratissimum* (1:3) fed to broilers and in a meat formulation. Quantification of thymol, carvacrol and eugenol were made for standardization and EOB were inject to gas chromatography-mass spectrophotometer to determine the compounds profile. The EOB was characterized by 1 part thymol + carvacrol and 3 parts eugenol and then microencapsulated (20% oil + 80% maltodextrin). The inclusion levels of the EOB (0, 70, 140 and 700 ppm) in the microencapsulation form plus a negative control (150 ppm ethoxyquin) did not affect the feed intake of the birds and also the pH of the breast and thigh meat. A breast and thigh precooked meatballs of each group were analyzed for secondary lipid oxidation products (as TBARS). In addition, 0; 150 ppm of BHT, 70 and 140 ppm of microencapsulated EOB was mixed in the breast and thigh meat from birds from the group without the addition of antioxidants. Meatballs from chickens feed supplemented groups showed lower TBA-value than those from group without antioxidant additives, mainly in the thigh meat. The highest level of inclusion (700 ppm) presented the best results in containing the oxidative processes of refrigerated meatballs. For the assay with the meat matrix, the mix of both, BHT and EO, were efficient to prevent lipid oxidation in precooked samples of breast and thigh when compared to control group. However, the inclusion of 140 ppm of EOB in the thigh meat control even more effectively than the synthetic antioxidant. We concluded that the microencapsulated EOB from *T. vulgaris* and *O. gratissimum* was effective to control oxidative processes both in the diet of broilers as well as in a meat formulation.

1. Introdução

O consumo de carnes tem aumentado de forma gradativa no mundo e pelas estatísticas da FAO (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura), entre os anos de 2015 e 2030 a taxa de crescimento representará, em média, 1,5 %. No caso da carne de frango, este aumento será de 2,4 %, superior ao das carnes bovina (1,2 %) e suína (0,8 %). Outra constatação deste órgão é que o aumento do consumo de carnes é oriundo de um aumento da renda populacional e da urbanização, o que resulta em maior capacidade de consumo e demanda por produtos de maior praticidade. Além do mais, quesitos relacionados

com segurança alimentar ganham cada vez mais notoriedade, refletindo em uma nova percepção dos consumidores.

Neste cenário, as empresas buscam fabricar produtos de acordo com as novas exigências do mercado, contemplando desde o respeito ao bem estar animal a investimentos na linha de produtos com menos aditivos sintéticos e na oferta de pratos pronto para o consumo ou *ready-to-eat* (Brasil Food Trends 2020, 2010).

Devido à natureza do processo e sua composição, os produtos cárneos pré-cozidos como almôndegas, empanados do tipo *nuggets* e hambúrgueres têm tendência à rápida oxidação, implicando em uma vida útil mais curta. Carnes moídas estão sujeitas a mudanças oxidativas e desenvolvimento de rancidez mais rapidamente que os músculos íntegros, uma vez que pelo aumento da superfície de contato estão mais expostas ao ar e a contaminação microbiológica (MIN; AHN, 2005). O processo de rancidez oxidativa ou peroxidação lipídica é acentuado durante o manuseio, processamento, armazenamento e cozimento dos produtos cárneos (MORRISSEY et al., 1998, SOLADOYE et al., 2015), sendo as mudanças na qualidade manifestadas por alterações adversas como sabor, cor, textura, valor nutritivo e ainda pela possibilidade de produção de compostos tóxicos (ROBEY; SHERMER, 1994; MATHIAS et al., 2010). Rhee et al. (1996) afirmaram que o potencial oxidativo dos tecidos musculares é diferente para as diferentes espécies, sendo a carne de frango bastante suscetível, especialmente após o cozimento. De fato, existe uma relação positiva entre o número de insaturações e o nível de oxidação (MIN et al., 2008) e a carne de frango é rica em ácidos graxos poli-insaturados (HAUTRIVE et al., 2012). Além disso, foi comprovado que a inclusão de cloreto de sódio utilizado de forma abundante nos produtos processados, tem ação pró-oxidante agindo como um catalizador das reações de oxidação (TANG et al., 2001).

Por ser fator limitante da qualidade e da vida útil de produtos cárneos, principalmente aqueles processados e pré-cozidos, além de impactar na aceitação por parte dos consumidores devido ao aparecimento do ranço ou formação de “warmed over flavours”, que é o sabor requentado (LANARI et al, 2004), medidas como o uso de compostos antioxidantes vem sendo utilizadas como estratégias para prevenir ou retardar os processos de oxidação lipídica.

Os antioxidantes sintéticos têm sido largamente utilizados na indústria de alimentos como conservantes alimentares, devido à sua eficácia e baixo custo, sendo o BHT (butilhidroxitolueno), BHA (butilhidroxianisol), TBHQ (butilhidroxiquinona terciária) e PG (propil galato) os mais empregados (SOUZA et al., 2007). Entretanto, com o crescente interesse em produtos que sejam naturais para aplicações alimentares, há um aumento nas

pesquisas relacionadas a estes produtos, sendo, dentre estas, uma opção os óleos essenciais de plantas aromáticas que apresentam atividade antioxidante comprovada (BURT, 2004; WOJDYLO et al., 2007; WEI, SHIBAMOTO, 2010)

Os monoterpenos, que são estruturas compostas por 10 moléculas de carbono (C10), representam 90 % dos óleos essenciais. A maioria é volátil com grande variedade de estruturas químicas, podendo ser acíclicos, monocíclicos, aromáticos, etc. (BAKALI et al., 2008). Dentre estes, os fito constituintes derivados de fenol, tais como timol, carvacrol e eugenol são conhecidos como potentes agentes antioxidantes (DORMAN et al., 2000; HOFFMAN-PENNESI.; WU, 2010), além de serem classificados como GRAS (sigla em inglês para aditivos reconhecidos geralmente como seguros) pela FDA (Food and Drug Administration) podendo assim, serem utilizados na formulação de produtos alimentícios.

Nos últimos anos, diversas pesquisas têm demonstrado a viabilidade e o sucesso do uso de produtos naturais para reduzir a oxidação lipídica quando incorporado em produtos cárneos de aves (BOTSOGLOU et al., 2002 a, 2003 a; RACANICCI et al., 2004, 2008; BRAGAGNOLO et al., 2005; FRATIANNI et al., 2010; SELANI et al., 2011; DASHTI et al., 2015) e também um menor número verificando o efeito antioxidante na carne, através da suplementação das dietas destes animais (BOTSOGLOU et al., 2002 b, 2003 b; BOLUKBASI et al., 2006; LUNA et al., 2010). Apesar de serem escassos, trabalhos conduzidos *in vivo* sugerem o potencial dos óleos essenciais adicionados nas dietas de aves, como uma estratégia para melhorar a vida útil das carnes (WONG et al., 1995; BOTSOGLOU et al., 2002 a, b).

Entretanto, a falta de consistência nos resultados e padronização dos produtos, além de informações insuficientes sobre a atuação destes aditivos indica que são necessárias mais pesquisas para um uso seguro e com eficácia similar aos antioxidantes sintéticos.

Além do mais, por se tratar de substâncias voláteis, é preciso investigar técnicas para reduzir as perdas por dissipação e aumentar o tempo de armazenamento do produto. O processo de microencapsulação por *spray-drying* pode preservar de forma mais eficiente estes compostos das condições adversas do meio ambiente como oxigênio, luz e umidade, pois este estará envolto em um material de parede (DE VOS et al., 2010), além da facilidade para a inclusão nas dietas e dispersão homogênea na elaboração de produtos alimentícios.

Com o objetivo de explorar o uso dos óleos essenciais na forma microencapsulada, este estudo avaliou a atividade antioxidante de uma blenda composta por *Thymus vulgaris* e *Ocimum gratissimum*, sendo utilizada tanto em uma formulação cárnea, bem como aditivo na dieta de frangos de corte para verificar seu efeito sobre a estabilidade oxidativa de almôndegas pré-cozidas de carne de peito e de sobrecoxa.

2. Material e Métodos

2.1. Óleos essenciais

Os óleos essenciais de *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e *O. gratissimum* L. (alfavacão) foram obtidos comercialmente da empresa Terra Flor Aromaterapia, sendo os produtos certificados pela IBD como ingredientes naturais (<http://ibd.com.br/pt/IngredienteNaturalIbd.aspx>). Os óleos foram estudados na forma de blenda (BOE), na proporção 1:3 (*T. vulgaris*:*O. gratissimum*). Detalhes sobre a composição química e caracterização dos compostos majoritários para a padronização do produto são apresentados no APÊNDICE 1.

2.2. Determinação do teor de compostos fenólicos totais e da atividade antioxidante pela capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC)

Antes da realização dos ensaios, a BOE na forma pura (líquida) foi diluída em acetona (0,05 g de BOE em 1 mL de acetona 99 % P. A.), de acordo com a proposta de Bentayeb et al. (2014). Para as análises foram considerados controles de acetona pura e de maltodextrina, além do branco. Também, a amostra da BOE foi microencapsulada, sendo diluída diretamente em água Milli-Q. Maiores detalhes sobre o processo de microencapsulação por *spray dryer* são apresentados no APÊNDICE 2.

Fenólicos totais: O teor de fenólicos totais presentes nas amostras da BOE na forma pura e microencapsulada foi determinado pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu utilizando o ácido gálico como padrão (SINGLETON et al., 1999). A partir de uma solução mãe das amostras com OE foram realizadas diluições seguidas até atingir os valores de 1,0; 0,5; 0,25 e 0,125 mg / mL. No escuro, as amostras foram diluídas com água Milli-Q (1 : 16) e adicionado 50 µL do reagente Folin-Ciocalteu (Sigma - Aldrich), seguido de 100 µL de solução de carbonato de sódio 10 %, sendo mantidas em temperatura ambiente por 2 h. A cor azul produzida na redução do reagente pelos fenólicos foi medida em espectrofotômetro a 725 nm (marca Shimadzu, modelo UV mini 1240). A curva padrão de sete níveis (16 – 500 mg / mL) foi baseada em ácido gálico de grau analítico. Os resultados foram expressos em conteúdo equivalente de ácido gálico (mg EAG / mg matéria seca). As análises foram realizadas em triplicata.

Capacidade de absorção do radical oxigênio (ORAC): O método descrito por Cao et al. (1993) com adaptações de Dávalos et al. (2004) quantifica o efeito de proteção de um antioxidante na presença do radical peroxil gerado pelo AAPH. A avaliação é feita considerando a área sob a curva de decaimento de fluorescência da amostra quando comparada com o branco. Trolox, um análogo solúvel em água da vitamina E, foi usado como um padrão de controle antioxidante. Uma curva padrão com 10 diferentes concentrações de Trolox (de 1,5 a 1500 μM de concentração final) também foi testada para estabelecer a curva padrão. A partir de uma solução mãe das amostras com a BOE foram realizadas sete diluições (0,15625 – 10 mg/mL para a amostra pura e de 0,0078 – 5 mg / mL para a amostra microencapsulada). Similarmente, foi avaliada a maltodextrina para verificar alguma influência no resultado. Em resumo, a reação acontece devido a presença de 20 μL de amostra + 120 μL de fluoresceína + 60 μL de APPH, adicionadas em cada poço da microplaca. A fluorescência é então monitorada e registrada a cada 56 seg durante aproximadamente 75 min, em Fluorímetro FloustarOptima (BMG LABTECH, Alemanha) a 37 °C e com filtro de excitação de 485 nm e de emissão de 520 nm. As análises foram feitas em triplicata. Os resultados obtidos para a BOE na forma pura e microencapsulada foram expressos como concentração de trolox (equivalente μM /mL da amostra na matéria seca).

2.3. Avaliação do consumo e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com níveis crescentes da BOE

Foi realizado um experimento com frangos de corte no Aviário Experimental do Departamento de Zootecnia da Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo (Esalq/USP). Todos os procedimentos utilizando animais foram submetidos à “Comissão de Ética do uso de animais em pesquisas – CEUAP” da Esalq/USP.

2.3.1. Manejo experimental

No primeiro dia do experimento, aves com pesos homogêneos foram alojadas em gaiolas em uma sala previamente limpa e desinfetada. As gaiolas foram alocadas em um galpão de alvenaria, sendo a temperatura ambiente ideal para as aves obtida através do manejo de cortinas, ventiladores e exaustores. O aquecimento nos primeiros dias de vida foi realizado por lâmpadas dispostas em cada gaiola.

O período experimental foi de 35 dias, com fornecimento de água e ração à vontade para as aves. As dietas dos tratamentos, todas na forma farelada, foram compostas

por milho e farelo de soja, além de óleo de soja. Todos os macro e micro ingredientes estavam presentes na mesma quantidade entre os tratamentos, sendo a única diferença a inclusão da BOE na forma microencapsulada e/ou maltodextrina, que se alteravam na relação entre as dietas. O antioxidante Etoxiquim (Impexquin 66 %, Impextraco – Bélgica) foi adicionado em substituição à sílica (inerte). Foi fornecida uma dieta única sem a inclusão de antibióticos, coccidiostáticos, enzimas e antioxidantes (apenas aquele contido no premix para preservar as vitaminas) para cada tratamento, sendo formuladas para atender ou exceder as exigências do National Research Council - NRC (1999). A composição dos ingredientes e níveis nutricionais da dieta padrão está indicada na Tabela 1.

Tabela 1. Inclusão dos ingredientes e composição calculada da dieta padrão

Ingredientes	Inclusão, %
Milho	65,62
Farelo de soja	28,86
Maltodextrina / BOE	0,35
Óleo de soja	0,47
Calcário	1,19
Fosfato monocalcico	1,56
Sílica	0,50
DL-Metionina 98 %	0,32
L-Treonina 98.5 %	0,10
L-Lisina HCL 99 % (78 %)	0,37
Colina 60 %	0,08
Sal	0,49
Suplemento vitaminico ¹	0,05
Suplemento mineral ²	0,05
Total	100,0
Composição calculada	
EMA, kcal/kg	3.000
Lisina Digestível, %	1,187
Met+Cis Digestível, %	0,867
Treonina Digestível, %	0,93
Cálcio, %	0,90
Fósforo Disponível, %	0,45

¹ Composição vitamínica por kg de ração: 1,2 mg de ácido fólico; 15 mg de ácido pantotênico; 0,08 mg de biotina; 42 mg de niacina; 10.000 UI vitamina A; 2,5 mg de tiamina; 18 mg de vit B12; 6,5 mg de riboflavina, 3,5 mg de piridoxina; 2500 UI vit D3; 18,75 UI vit E; 2 mg vit K3² Composição mineral por kg de ração: 7,5 mg de cobre; 45 mg de ferro, 0,75 mg de iodo; 75 mg de manganês; 70 mg de zinco; 0,3 mg de selênio.

De acordo com a quantidade de retenção da BOE nas micropartículas (20 %), os tratamentos, com níveis crescentes de inclusão nas dietas, foram designados de acordo com a Tabela 2.

Tabela 2. Descrição dos tratamentos, nível de princípio ativo por tratamento e quantidade de microcápsulas incluídas nas dietas experimentais.

Descrição	Nível de princípio ativo, ppm	Inclusão na dieta, ppm
T1- Controle	0	0
T2- Etoxiquim	150 de etoxiquim	227
T3- BOE70	70	350
T4- BOE140	140	700
T5- BOE700	700	3500

As aves, machos da linhagem Cobb500, foram criadas até 21 dias de idade, separadas por tratamento, sendo 24 aves/tratamento. Durante este período, o consumo de ração foi analisado nos intervalos de 3, 7, 10, 14 e 21 dias de idade. Aos 21 dias de idade, uma amostra de aves de cada tratamento com pesos homogêneos foi transferida para gaiolas maiores onde permaneceram até os 35 dias de idade. De 21 a 35 dias, cada ave foi considerada uma unidade experimental (repetição), sendo oito aves/tratamento.

Ao final do experimento (35 dias de idade) todas as aves de cada tratamento foram abatidas por deslocamento cervical, para determinação do rendimento de peito e sobrecoxa (ambos com osso e com pele) e tamanho de fígado. Após pesagem, o peito e a sobrecoxa direita de cada ave foram desossadas e retiradas a pele e cartilagem. Antes das partes serem embaladas, estas foram colocadas em um balde com gelo (*chiller*) por 10 min, identificadas e armazenadas em câmara fria à - 20 °C por 24 h.

2.3.2 Análise de pH na carne dos frangos

Após 24 h em câmara fria, as amostras foram retiradas, sendo uma repetição de cada vez para realização da análise de pH. O objetivo principal desta análise foi para padronizar as peças que seriam utilizadas no ensaio de oxidação lipídica, ou seja, todas dentro de um mesmo intervalo de pH . As medições de pH foram determinadas pela leitura direta em pHmetro digital (Oakton pH 300 serie 35618, Illinois, EUA) previamente calibrado com soluções tampão de pH 4,0 e 7,0, através da introdução do eletrodo no músculo (IAL, 2008). Também a temperatura da peça era monitorada com o auxílio de um eletrodo de vidro (Digimed, São Paulo, Brasil). Foram tomados seis pontos diferentes de leitura por amostra e considerada a média. A seguir, as partes de peito e sobrecoxa foram armazenadas a vácuo

(Sealer Selovac 300 B, São Paulo, Brasil) em sacos plásticos com baixa permeabilidade ao oxigênio e devidamente identificados, sendo congeladas à - 20 °C até a realização das análises posteriores.

2.3.3. Preparo das amostras para os ensaios de oxidação lipídica na carne

No preparo das amostras, buscou-se simular uma condição comercial de produto cárneo pronto para consumo, como almôndegas, com o objetivo de submeter a carne aos desafios inerentes ao processo como moagem, adição de sal, processamento térmico e vida útil.

Desta forma, as amostras de carne (peito e sobrecoxa) foram descongeladas durante uma noite sob refrigeração à 4 °C. Em seguida, toda gordura aparente foi retirada e as partes moídas conjuntamente em moedor de carne (peneira de 0,8 cm; Myralux, 1200 W, São Paulo, Brasil), sendo formado, por tratamento, um *pool* de peito e outro de sobrecoxa. Em média foi obtido um total de 5,0 kg de peito e 3,5 kg de sobrecoxa para cada tratamento.

Para todos os tratamentos foi adicionado 0,5 % de cloreto de sódio à massa cárnea que foi homogeneizada e pesada em porções de 30 ± 1 g de carne e, em seguida moldadas no formato de almôndegas. As almôndegas foram embaladas a vácuo (máquina TecMac, TM – 250) em saco de polietileno com baixa permeabilidade ao oxigênio, sendo seis de cada tratamento/embalagem, e cozidas em água fervente a 100 °C durante 8 min, de acordo com metodologia proposta por Racanicci et al. (2004). Em seguida, os pacotes foram resfriados em água com gelo e as almôndegas novamente ensacadas, sem vácuo, em embalagens de polietileno com alta taxa de permeabilidade ao oxigênio, sendo estocadas no escuro em câmara fria (Nova Ética, 412-D) a 4 ± 1 °C. Cada embalagem foi identificada e composta por almôndegas referentes aos tratamentos experimentais.

Na Figura 1 está ilustrado o esquema de preparo das amostras experimentais para os ensaios de oxidação lipídica na carne de peito e sobrecoxa dos frangos de corte (Fotos A, B, C, D, E e F).



A). Carne com gordura removida e cortada.



B). Cada tratamento moído conjuntamente (*pool*).



C). Adição de cloreto de sódio à massa cárnea.



D). Almondegas moldadas.



E) Almôndegas embaladas a vácuo antes do pré cozimento.



F) Almôndegas cozidas, reembaladas e distribuídas na câmara fria.

Figura 1. Etapas do processo de preparação das amostras de almôndega de carne de peito e sobrecoxa dos frangos de corte utilizados no experimento.

2.3.4 Incorporação da BOE na formulação das almôndegas

Este ensaio verificou o efeito antioxidante da BOE misturada diretamente na carne crua, sendo avaliada a oxidação lipídica antes (crua) e logo após o processamento térmico (cozida). Uma quantidade do *pool* de carne de peito e sobrecoxa provenientes das aves do grupo Controle (T1), ou seja, sem adição de aditivos antioxidantes, foi separada, sendo uma média de 2 kg de massa de peito e 1 kg de massa de sobrecoxa, seguindo o mesmo procedimento descrito no item 2.3.3.

Foram aplicados os seguintes tratamentos, de acordo com a Tabela 3.

Tabela 3. Descrição dos tratamentos, nível de princípio ativo por tratamento, quantidade de microcápsulas incorporadas à carne e a matriz de carne utilizada.

Descrição	Nível do princípio ativo, ppm	Incorporação na carne, ppm	Tipo de matriz de carne
T1- Controle	0	0	Peito e sobrecoxa
T2- BHT*	150	150	Peito e sobrecoxa
T3- BOE70**	70 de OE	350	Peito
T4- BOE140	140 de OE	700	Peito e sobrecoxa

*BHT; 99,9 % P. A., Sigma – Aldrich

** para a carne de sobrecoxa não foi aplicado o T3, com a inclusão de 70 ppm da BOE, devido a quantidade limitada desta matriz de carne.

2.3.5. Oxidação lipídica - Análise de TBARS

As análises das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram realizadas no Laboratório de Nutrição Animal da FAV/UnB (Universidade de Brasília) localizado na Fazenda Água Limpa em Brasília – DF.

As amostras de carne de peito e sobrecoxa de todos os tratamentos foram submetidas à avaliação de estabilidade oxidativa através da reação com o ácido 2-tiobarbitúrico. O princípio do método é quantificar o malonaldeído (MDA), um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poli-insaturados, formados durante o processo oxidativo. A metodologia foi realizada de acordo com Vyncke (1970), com algumas modificações (SØRENSEN; JØRGENSEN, 1996). Para a extração dos aldeídos, 5 g da carne foi homogeneizada em tubos do tipo falcon com o auxílio de Ultra-Turrax (Ika T25) por 45 seg a 13.500 rpm. Juntamente com a carne foram adicionados 15 mL de solução contendo 7,5 % de ácido tricloroacético (TCA, Merck, Darmstadt, Alemanha), 0,1 % de propil galato (GP, Sigma – Aldrich) e 0,1 % de ácido etilenodiamino tetra-cético (EDTA, Merck, Darmstadt, Alemanha). Após a solução ser filtrada (filtro de papel de 12,5

mm), em todos os tubos de ensaio foram adicionados 5 mL do filtrado e 5 mL do reagente TBA (0,02 M, Sigma - Aldrich), sendo mantidos em banho-maria a 100 °C por 40 min. Nesta etapa ocorre a reação que envolve o ácido 2-tiobarbitúrico com o MDA para formação do composto cromóforo de cor vermelha e, em seguida, resfriados em água com gelo. A absorbância foi medida nos comprimentos de onda de 532 e 600 nm em espectrofotômetro Gehaka (modelo UV 340 G) em relação ao branco (mesma solução sem os aldeídos provenientes da carne). A diferença, $Abs_{532nm} - Abs_{600nm}$ foi usada como valor de absorbância corrigida pela turbidez. O resultado foi expresso como μM de malonaldeído por kg de amostra de carne, a partir de uma curva padrão (0,1 – 6,0 μM) de TEP (1,1,3,3 – tetraetoxipropano, Merck). Assim, o número de TBARS das amostras foi calculado da seguinte maneira:

$$TBARS = \frac{[I] \text{ medida no espect.} * (\text{teor de água da amostra} + \text{água adicionada (TCA)})}{\text{Peso da amostra}}$$

A concentração ([I]) medida no espectrofotômetro é determinada a partir da equação de regressão linear gerada pela curva padrão, sendo: $Abs = \beta + \alpha * Y$ resultando em $Y = (Abs - \beta) / \alpha$, que é a concentração por litro. Para ter a concentração por quilo da amostra, multiplica-se pela quantidade de líquido medido (teor de água a partir da amostra e o adicionado com o TCA). Sendo:

TBARS = valor TBARS medidos em μmol malonaldeído por quilo de carne.

Abs = absorbância da amostra: $Abs_{532} - Abs_{600} - (Abs_{cego(532)} - Abs_{cego(600)})$

α = inclinação da curva padrão

β = intercepto com o eixo y na curva padrão

Para o ensaio de incorporação das microcápsulas de BOE diretamente na carne, o nível de TBARS das almôndegas foi avaliado antes (carne crua) e após o processamento térmico. Foi analisada apenas uma amostra antes do cozimento representando todos os tratamentos. Após o cozimento, foram analisadas 4 amostras/tratamento.

Para o ensaio de inclusão da BOE microencapsulada na dieta das aves, o nível de TBARS das almôndegas foi avaliado após o processamento térmico (amostras cozidas) no dia 0 e após 2, 4 e 7 dias sob refrigeração a 4 °C. Foram analisadas 6 amostras/dia/tratamento.

2.3.6. Caracterização das almôndegas de carne de frango pré-cozidas

Foram realizadas as análises para caracterização de carne de peito e sobrecoxa. Para isso, amostras de cada repetição de um mesmo tratamento foram homogeneizadas formando um *pool* por tratamento, e analisadas em duplicata no primeiro dia, após o processamento térmico. As análises de composição incluíram:

Umidade: A determinação da umidade foi realizada nas amostras de carne antes e após o processamento térmico, segundo o método descrito pelo Instituto Adolfo Lutz (2005). Uma amostra de 5 g foi pesada em um cadinho previamente tarado e levada a estufa a $105\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 5\text{ }^{\circ}\text{C}$, durante 4 h. Após resfriar em dessecador até temperatura ambiente, a amostra foi novamente pesada e o valor de umidade determinado, sendo expresso em porcentagem.

Extrato Etéreo: O teor de extrato etéreo da amostra foi determinado pelo método de Bligh; Dyer (1959). Este método é descrito por ser uma extração a frio dos lipídios da amostra, realizada antes da quantificação do perfil de ácido graxo no cromatógrafo gasoso. A extração se baseia na mistura da amostra de carne com metanol, clorofórmio e água. Após agitação e repouso para separação de fases, a solução é filtrada e o sobrenadante, descartado. Os lipídios ficam misturados ao clorofórmio que, após evaporação por banho-maria ($80\text{ }^{\circ}\text{C}$) são pesados e quantificados.

Perfil de ácidos graxos: Após extração dos lipídios das amostras de carne foi determinado o perfil de ácidos graxos segundo metodologia proposta pela AOAC (2007). Foi utilizado um cromatógrafo gasoso com detector FID operando a $260\text{ }^{\circ}\text{C}$ e equipado com um injetor Split, coluna TR-FAME (Thermo Scientific, $120\text{ m} \times 0,25\text{ mm ID}$, $0,25\text{ }\mu\text{m}$ film). O gás de arraste utilizado foi o He, 1 mL/ min . A identificação foi realizada por comparação dos tempos de retenção dos padrões com os tempos de retenção da amostra, e a quantificação por padronização interna, utilizando-se o triglicéride tridecanóico (C13:0) como padrão interno. As gorduras saturadas e insaturadas foram calculadas com a soma de seus respectivos ácidos graxos. Os resultados foram expressos como % total dos teores de ácidos graxos nas amostras de carne.

2.4. Análise Estatística

Os dados para o consumo de ração, peso relativo da carcaça, pH e TBARS (para efeito de processamento térmico) foram comparados em relação ao grupo controle e comparados pelo teste de Dunnet no nível de probabilidade de $p < 0,05$. O teste de Levene foi

aplicado para testar a homogeneidade das variâncias. Para os valores de TBARS nas amostras de carne, a inclinação da reta (slope), os tratamentos (Controle, Etoxiquim e níveis da BOE) e os dias de armazenamento (0, 2, 4 e 7 dias) foram analisados pelo teste de Tukey para determinar as diferenças entre as médias no nível de probabilidade de $p < 0,05$.

3. Resultados e Discussão

3.1. Determinação de fenólicos totais e atividade antioxidante

As análises para determinar a quantidade de fenólicos totais e a capacidade antioxidante da BOE foram realizadas antes e após a microencapsulação da amostra (Tabela 4). O nosso objetivo nestes ensaios foi verificar perdas durante o processo por *spray drying*, uma vez que a amostra líquida é composta por substâncias que podem se volatilizar na presença de alta temperatura (acima de 100 °C).

Tanto os valores de fenólicos totais como a atividade antioxidante determinada pelo método do ORAC da amostra líquida foram bem superiores aos da amostra microencapsulada (Tabela 4). Este resultado era esperado, dado que apenas uma média de 18 % da BOE (base matéria seca) está presente nas micropartículas, como relatado no Apêndice 2. Considerando 100 % os valores de 116 e 1105 determinados na forma líquida, respectivamente, para fenólicos totais e ORAC, observa-se que a proporção dos resultados na forma microencapsulada foi de 28 e 22 % para estas mesmas análises, sendo até mesmo superior aos 18 % esperados. Este resultado nos embasa para afirmar que o processo por *spray drying* a que foi submetida à amostra líquida não afetou a quantidade de fenólicos ou mesmo a atividade antioxidante quando na forma de micropartículas. Como descrito, o uso da maltodextrina como material de parede durante o processo de *spray drying* exerce um efeito protetor sobre os compostos fenólicos e, como consequência, em sua atividade antioxidante. Este fato foi anteriormente constatado por vários autores (ROBERT et al., 2010; BAKOWSKA-BARCZAK; KOŁODZIEJCZYK, 2011; WU et al., 2014; PANG et al., 2014; NUNES et al., 2015) e confirmado no presente estudo.

Tabela 4. Fenólicos totais e atividade antioxidante (ORAC) da BOE na forma líquida e microencapsulada. Resultados, expresso com base na matéria seca (MS).

Natureza da amostra	Fenólicos totais	ORAC
	(mg EAG/mg MS)	(μ M trolox/mg MS)
BOE líquida	116 $\pm$ 0,88 (100 %)	1105 $\pm$ 39 (100 %)
BOE microencapsulada	32 $\pm$ 1,36 (28 %)*	238 $\pm$ 17 (22 %)*

¹ Resultados expressos como média das triplicatas $\pm$ DP

(*) Porcentagem relativa considerando a amostra na forma líquida como 100 %.

De fato, é relatado amplamente a atividade antioxidante *in vitro* tanto de extratos herbais como dos óleos essenciais de *T. vulgaris* e de seu composto majoritário timol (KÄHKÖNEN, et al., 1999; YANISHLIEVA, et al., 1999; LEE et al., 2005; SACCHETTI et al., 2005; BOZIN et al., 2006; WOJDYLO et al., 2007; WEI; SHIBAMOTO, 2010; BENTAYEB et al., 2014, DAWIDOWICZ; OLSZOWY, 2014), assim como do *O. gratissimum* ou seu composto eugenol (DORMAN, et al., 2000; PEREIRA; MAIA, 2007; PRABHU et al., 2009; NAGABABU et al., 2010; DAWIDOWICZ; OLSZOWY, 2012; PANDEY et al., 2014), através de diversificadas metodologias de análises, porém de forma consistente e por diversas vezes melhor do que antioxidantes sintéticos como BHT, BHA e alfa - tocoferol.

3.2. Consumo de ração pelas aves alimentadas com os diferentes níveis da BOE

Com a BOE na forma microencapsulada e com comprovada atividade antioxidante, iniciou-se o ensaio com os frangos de corte avaliando níveis crescentes de inclusão da BOE nas dietas. O desempenho das aves neste mesmo período e com os mesmos níveis de inclusão da BOE foi discutido previamente, no Capítulo 2, constando do mesmo experimento.

Neste ponto, o objetivo foi construir uma curva de consumo da dieta por tratamento, pois era importante avaliar de forma mais detalhada a quantidade de ração ingerida pelas aves em cada nível de inclusão da BOE. Assim, no período de 1 a 21 dias de idade das aves o consumo foi avaliado nos intervalos de 1 a 3, 3 a 7, 7 a 10, 10 a 14 e 14 a 21 dias (Figura 4), com a finalidade de verificar alguma alteração na aceitabilidade da dieta pelas aves contendo níveis crescentes da BOE. Não foi observada diferença alguma entre o

consumo das aves dos tratamentos com os níveis da BOE em relação àquelas do grupo Controle ou Etoxiquim, em nenhum dos períodos de avaliação. Na realidade, o consumo de ração foi muito semelhante entre os diferentes tratamentos, indicando que não houve qualquer tipo de interferência em nenhum período quando da adição da BOE microencapsulada na dieta das aves e sendo um ponto positivo na avaliação desta categoria de aditivo.

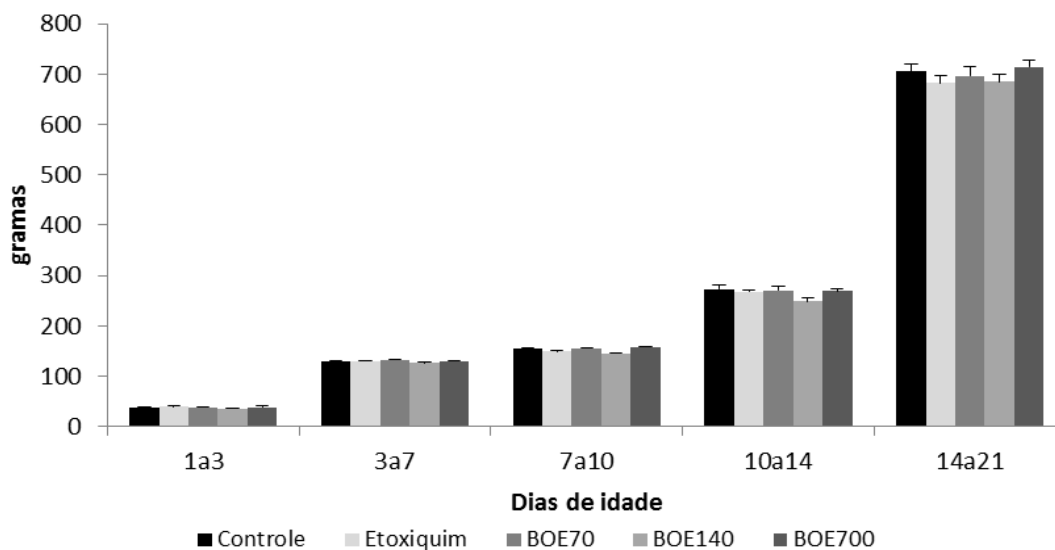


Figura 4: Consumo de ração das aves em diferentes intervalos no período de 21 dias. Dados são médias de 4 repetições/tratamento $\pm$ erro padrão ($p > 0,05$ pelo teste de Dunnet). Controle = sem adição de aditivo; Etoxiquim = 150 ppm etoxiquim; BOE= blenda de óleos essenciais na forma microencapsulada representada pelos tratamentos: BOE70 =70 ppm; BOE140 = 140 ppm; BOE700= 700 ppm.

Uma preocupação com a baixa ingestão de ração ou com diferenças entre os tratamentos seria a ação dos compostos antioxidantes no organismo do animal, podendo não agir de forma protetora na validação da oxidação lipídica na carne. Também, de forma geral, foi observado se poderia haver algum prejuízo no desempenho das aves ou alguma constatação visual nos animais que pudesse comprometer o uso destas substâncias, o que não foi verificado. Há indicações de que extratos herbais ou óleos essenciais quando adicionados nas dietas das aves, além de não prejudicar o consumo, melhoram a digestibilidade dos nutrientes, devido a sua ação no estímulo da secreção de enzimas digestivas, promovendo, assim, uma melhora na conversão alimentar (HERNANDEZ et al., 2004; TIIHONEN et al., 2010, HASHEMIPOUR et al., 2013; KHATTAK et al., 2014). De fato, o efeito promotor de crescimento destas substâncias naturais em frangos de corte ainda não está bem apoiado pelas pesquisas científicas, com muitos resultados controversos até os dias de hoje. Hashemipour et

al. (2013) investigando o efeito de níveis (0, 60, 100, e 200 mg/kg na dieta) de uma blenda 1 : 1 de timol: carvacrol sobre o desempenho de frangos de corte durante 42 dias observaram uma diminuição linear ($p < 0,05$) no consumo de ração, mas um maior ganho de peso e eficiência alimentar ($p < 0,05$) para as aves que consumiram 200 mg/kg do produto fitogênico durante o período. Em contrapartida, Haselmeyer et al. (2015) avaliaram níveis crescentes (0,1; 0,2; 0,3 e 1,0 % p:p) de inclusão de tomilho (folhas e flores em pó) nas dietas de frangos de corte durante 35 dias e não determinaram diferenças significativas para as variáveis de desempenho entre os tratamentos.

Esta variabilidade de resposta entre os estudos pode ser atribuída tanto ao tipo e níveis de inclusão dos óleos essenciais e extratos herbais utilizados, como a composição da dieta basal, ou mesmo à carga microbiana do ambiente onde as aves foram criadas (KHATTAK et al., 2014). Nesta linha, nossos dados contribuem para demonstrar que o consumo de dieta com diferentes níveis da BOE de *T. vulgaris* e *O. gratissimum* pelas aves, se manteve inalterado durante os 21 dias de avaliação.

3.3. Rendimento de carcaça e pH da carne das aves alimentadas com a BOE

A inclusão de 700 ppm da BOE na dieta das aves promoveu uma melhora significativa do rendimento de peito em comparação àquelas do tratamento Controle ($p < 0,05$) (Tabela 5). Este resultado não refletiu nos demais tratamentos com a BOE ou mesmo com o Etoxicum; nem tampouco no rendimento de sobrecoxa ($p > 0,05$). Na realidade, não se esperava um efeito de melhoria na produção de carne com a inclusão da BOE nas dietas dos frangos, até porque a ação de óleos essenciais nas variáveis de rendimento de carcaça é pouco explorada na literatura. Bolukbasi et al. (2006) avaliaram a inclusão de 100 e 200 mg/kg de óleo de tomilho na dieta de frangos de corte sobre o peso de peito e não verificaram diferenças em relação ao grupo sem adição dos aditivos. Khattak et al. (2014) notaram uma melhora no rendimento de peito das aves que consumiram uma blenda comercial composta por uma mistura de OE nas inclusões de 300 e 400 ppm, mas não com a inclusão de 500 ppm, concordando com nossos resultados em que o maior nível (700 ppm, BOE700) não afetou esta variável.

Tabela 5. Efeito da inclusão de aditivos antioxidantes sobre o peso relativo do peito, sobrecoxa e fígado das aves aos 35 dias de idade¹.

Tratamentos ²	Controle	Etoxiqum	BOE70	BOE140	BOE700
Rendimento ³ , %					
Peito	25,47 ± 0,21	26,34 ± 0,19	27,16 ± 0,21	28,21 ± 0,18*	24,94 ± 0,17
Sobrecoxa	18,61 ± 0,09	18,59 ± 0,08	18,13 ± 0,07	18,08 ± 0,05	18,51 ± 0,06
Fígado	2,19 ± 0,03	2,19 ± 0,03	1,98 ± 0,03	1,89 ± 0,03	2,34 ± 0,03
pH ⁴					
Peito	5,92 ± 0,03	5,96 ± 0,03	5,81 ± 0,03	5,93 ± 0,02	5,90 ± 0,03
Sobrecoxa	5,93 ± 0,02	6,09 ± 0,02	6,04 ± 0,03	5,95 ± 0,02	6,03 ± 0,02

¹ Dados são médias de 8 repetições/ tratamento ± erro padrão. ² Controle = sem adição de aditivo; Etoxiqum = 150 ppm etoxiquim; BOE = blenda de óleos essenciais na forma microencapsulada representada pelos tratamentos: BOE70 = 70 ppm; BOE140 = 140 ppm; BOE700 = 700 ppm.

³ Rendimento (%) = (peso peito ou sobrecoxa ou fígado/peso da ave viva) x 100. ⁴ pH médio de 6 pontos por peça. * tratamentos que diferem do Controle pelo teste de Dunnet (p < 0,05).

O peso relativo do fígado das aves que consumiram o tratamento com BOE700 apresentou o maior valor relativo numérico (2,34 %), mas não suficiente para ser diferente do fígado das aves do tratamento Controle ou Etoxiqum (ambos com 2,19 %) (Tabela 5). Nosso resultado concorda com aquele demonstrado no trabalho de Lee et al. (2004) que avaliaram a inclusão de 200 ppm de timol e, discorda dos dados apresentados por Bolukbasi et al. (2006) que constataram um aumento do peso do fígado das aves do grupo controle em comparação ao tratamento com óleo de tomilho.

Esta análise objetivou verificar algum sinal de intoxicação ou estímulo na produção de enzimas hepáticas relacionadas à atividade antioxidante e o consequente aumento do fígado quando da ingestão da BOE. No trabalho realizado por Hashemipour et al. (2013), em que avaliaram o efeito de níveis crescentes (0, 60, 100, e 200 mg / kg) de uma blenda em proporção 1:1 de timol:carvacrol na dieta de frangos de corte, os autores identificaram um aumento linear da atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase no fígado das aves aos 42 dias de idade. Também, existem evidências da ação hepatoprotetora do óleo de tomilho (DEANS, et al, 1993) e das moléculas de timol (JANBAZ, et al., 2003) e eugenol (NAGABABU et al., 1995).

A avaliação visual do fígado das aves dos diferentes tratamentos não apresentou alterações (dados não apresentados). Desta forma, a hipótese de que a ingestão da BOE pelas aves pudesse afetar o tamanho ou aspecto do fígado não se comprovou no presente estudo.

O valor de pH não diferiu entre os tratamentos, tanto para a carne de peito quanto para a carne da sobrecoxa (Tabela 5). O pH é uma medida eficiente para determinar contaminação microbiana (SWANSON, 2011) e anomalias que afetam as qualidades funcionais da carne, devendo ser considerado como um importante fator de variação do produto (ALI et al., 1999; QIAO et al., 2001). Apesar de não ser tão comum como ocorre com a carne bovina, a anomalia DFD (que significa dura, firme e seca) pode também ocorrer em aves (LANGER et al., 2010), mas de forma menos frequente do que a anomalia PSE, que retrata uma carne macia, exsudativa e pálida. A carne PSE tem sido relatada como sendo um problema crescente na indústria de aves e é caracterizada por um rápido declínio do pH no *post-mortem*, enquanto a temperatura corporal permanece elevada. Este evento leva a desnaturação de proteínas, causando uma cor pálida e redução na propriedade de retenção de água (FLETCHER, 2002). A estrutura das carnes afetadas por estas anomalias influencia de forma direta na vida útil do produto (ALLEN et al., 1998), sendo assim importante em um estudo de oxidação lipídica verificar se há variações de pH entre os tratamentos.

3.4. Incorporação da BOE na formulação cárnea e o efeito na estabilidade oxidativa da carne

Na Tabela 6 é possível observar os dados referentes aos efeitos do processamento térmico sobre a carne e a ação dos antioxidantes avaliados. De forma geral, tanto nas almôndegas preparadas com a carne de peito como naquelas de carne de sobrecoxa, o processamento térmico atuou aumentando os níveis de malonaldeído (MDA), expressos como valores de TBARS. Fica evidente que as etapas de formulação de produtos cárneos, tais como moagem e cozimento favorecem as condições para o desenvolvimento de produtos de oxidação, como anteriormente descrito para carne de frango (BOTSOGLOU et al., 2002 a; MITSUMOTO et al., 2005; RACANICCI et al., 2011; SELANI et al., 2011). Além disso, Sheehy et al. (1993) relataram que o processamento térmico aumentou a oxidação lipídica em tecidos musculares de frango em até 10 vezes, comparados com tecidos crus. No presente trabalho, este aumento foi o dobro tanto para a carne de peito (0,54 x 1,06) quanto para a carne de sobrecoxa (1,54 x 3,08), respectivamente para a carne crua e a pertencente ao grupo controle, sem aditivos.

Tabela 6. Efeito da incorporação de aditivos antioxidantes sobre os valores de TBARS, expressos como μmol de malonaldeído (MDA)/kg carne de peito ou sobrecoxa¹.

Processadas termicamente					
Tratamentos²	Crua	Controle	BHT	BOE70	BOE140
Peito					
TBARs,	0,54 $\pm$ 0,02	1,06 $\pm$ 0,08	0,68 $\pm$ 0,02	0,66 $\pm$ 0,03	0,76 $\pm$ 0,04
Crua x demais³		p < 0,05	NS	NS	p < 0,05
Carnes processadas⁴		a	b	b	b
Sobrecoxa					
TBARs	1,54 $\pm$ 0,02	3,08 $\pm$ 0,08	1,78 $\pm$ 0,05	-	1,19 $\pm$ 0,03
Crua x demais³		p < 0,05	p < 0,05	-	NS
Carnes processadas⁴		a	b	-	c

¹ cada valor representa a média de acúmulo de MDA $\pm$ respectivo erro padrão.

² Crua = antes do processamento térmico; Controle = sem inclusão de aditivo; BHT = 150 ppm BHT; BOE = blenda de óleos essenciais na forma microencapsulada representada pelos tratamentos: BOE70 = 70 ppm; BOE140 = 140 ppm.

³ efeito do processamento térmico: diferença estatística em relação ao tratamento da carne Crua pelo teste de Dunnet (p < 0,05); NS= não significativo (p > 0,05).

⁴ efeito dos tratamentos após processamento térmico: a, b- letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Entretanto, nas almôndegas de carne de peito, os tratamentos que tiveram a inclusão de BHT e 70 ppm de BOE foram eficientes em conter a oxidação lipídica resultante deste aquecimento; uma vez que permaneceram com os níveis de TBARS sem diferença significativa quando comparado ao grupo da carne Crua, que não foi submetido ao processamento térmico. Enquanto no grupo Controle o aumento foi de 97 %, ou seja, quase o dobro da quantidade de MDA em relação à análise da carne crua, nas almôndegas com BHT e BOE70 este aumento foi de apenas 26 e 14 %, respectivamente. Na carne tratada com 140 ppm da BOE, o aumento de MDA foi de 41 %, bem superior àquele obtido com o valor de 70 ppm.

Comparando a carne de peito, em que o maior nível de MDA foi de 1,06 μmol , com a carne de sobrecoxa, que foi de 3,08 μmol , é afirmativo que esta é mais susceptível à peroxidação lipídica, assim como anteriormente demonstrado por outros autores (BOTSOGLOU et al., 2002 a, 2003 b; BOLUKBASI et al., 2006). A própria carne crua de sobrecoxa, normalmente exibe maiores níveis de MDA do que a carne de peito. Isto se deve a quantidade de fibras vermelhas que apresentam uma maior proporção de ferro e fosfolipídios em sua composição (RHEE et al., 1988; KRANER et al., 1999; WOOD et al., 2004), favorecendo o processo oxidativo. Além do mais, os níveis elevados de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) desta carne a torna mais predisposta a lipoperoxidação, uma vez que existe uma relação positiva entre o número de insaturações e o nível de oxidação (TANG et al., 2001; MIN et al., 2008).

Para as almôndegas de carne de sobrecoxa, apenas os níveis de TBARS do grupo BOE140 (140 ppm) não diferiram significativamente daqueles do tratamento com a carne crua ($p < 0,05$). Inclusive, os níveis de MDA da BOE140 permaneceram abaixo daqueles analisados para a carne que não foi cozida, demonstrando uma completa proteção contra o desenvolvimento dos níveis de MDA durante o aquecimento térmico. O tratamento sem aditivo (Controle) ou com a inclusão de BHT apresentaram níveis de TBARS superiores aos da carne crua, sendo de 99 e 14 %, respectivamente, demonstrando o efeito do aquecimento nos valores de TBARS, sendo bem evidente na carne sem qualquer proteção antioxidante.

Na comparação entre todos os tratamentos logo após o cozimento, ilustrados na Figura 5 (peito) e na Figura 6 (sobrecoxa), ambas que tiveram a inclusão de algum aditivo (BHT ou BOE) foram eficientes em conter os processos oxidativos, quando comparadas ao grupo Controle (sem inclusão de aditivo) ($p < 0,05$). Interessante notar que os valores de MDA entre os tratamentos com os aditivos incorporados nas almôndegas de peito não diferiram entre si, apresentando, em média, 65 % de quantificação de MDA em relação ao

grupo Controle. Possivelmente, por apresentar uma menor quantidade de gorduras em sua composição, a ação dos aditivos antioxidantes não seja tão pronunciada como observado na carne de sobrecoxa, em que o BHT manteve em 58 % os níveis de MDA em relação ao Controle e a BOE em 39 %, sendo estes (BHT e BOE) diferentes estatisticamente ($p < 0,05$). Inclusive esta diferença entre os tipos de músculo pode explicar porque o nível de 140 ppm da BOE funcionou de forma mais eficiente na carne de sobrecoxa do que na carne de peito, visto que a carne de sobrecoxa é mais susceptível a oxidação houve, assim, uma melhor ação antioxidante da BOE.

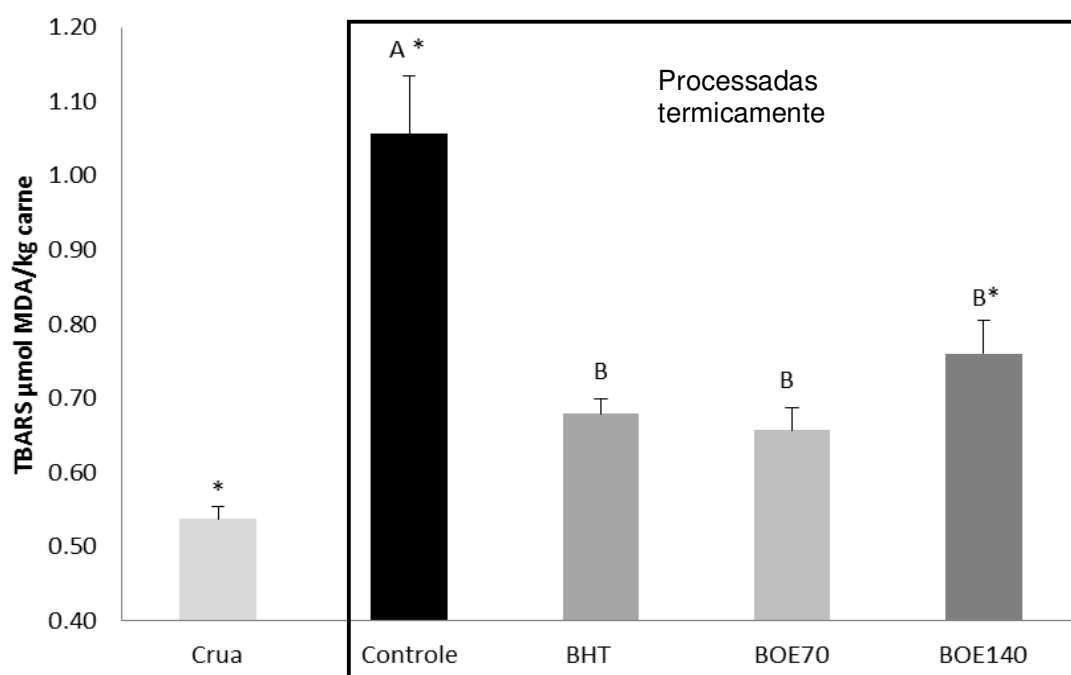


Figura 5. Valores médios $\pm$ respectivo erro padrão da formação de malonaldeído (MDA) antes e após o processamento térmico de almôndegas de **peito** de frangos. Crua = carne antes do processamento térmico; Controle = sem inclusão de aditivo; BHT = 150 ppm BHT; BOE = blenda de óleos essenciais na forma microencapsulada representada pelos tratamentos: BOE70 = 70 ppm; BOE140 = 140 ppm. * efeito do processamento térmico: diferença estatística em relação ao tratamento da carne Crua pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). A,B efeito dos tratamentos após processamento térmico: letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

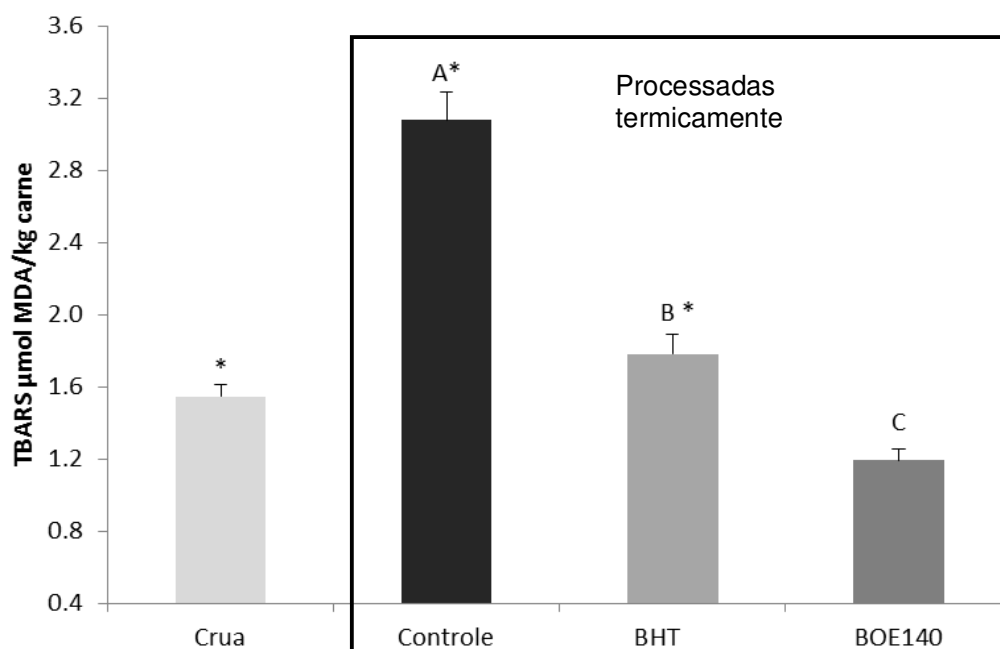


Figura 6. Valores médios $\pm$ respectivo erro padrão da formação de malonaldeído (MDA) antes e após o processamento térmico de almôndegas de **sobrecoxa** de frangos. Crua = antes do processamento térmico; Controle = sem inclusão de aditivo; BHT = 150 ppm BHT; BOE140 = blenda de óleos essenciais na forma microencapsulada representada pelo tratamento de 140 ppm OE. * efeito do processamento térmico: diferença estatística em relação ao tratamento da carne Crua pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). A,B efeito dos tratamentos após processamento térmico: letras maiúsculas diferentes representam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($P < 0,05$).

Com efeito, os óleos essenciais das espécies da Família Lamiacea, como os gêneros *Thymus* e *Ocimum* são reconhecidos por sua atividade antioxidante. O modo de ação destes óleos e seus constituintes é objeto de estudo de vários trabalhos. O que está bem documentado é que existe uma correlação positiva entre a quantidade de compostos fenólicos e atividade antioxidante (KÄHKÖNEN et al., 1999; ZHENG; WANG, 2001; KATSUBE et al., 2004; SHAN et al., 2005; WOJDYLO et al., 2007; DUDONNÉ et al., 2009), apesar de poder não ocorrer para algumas espécies (WOJDYLO et al., 2007). Os fenólicos são substâncias multifuncionais e podem atuar como agentes redutores, terminadores de radicais livres, quelantes de metais e supressores de moléculas reativas ao oxigênio (RICE-EVANS et al., 1996; MATHEW; ABRAHAM, 2006).

Os monoterpenos fenólicos que foram determinados na blenda como o timol, carvacrol e eugenol estão entre as moléculas de efeito antioxidantes mais ativas em ensaios *in vitro* (YANISHILIEVA et al., 1999; DORMAN et al., 2000). Assim, especiarias que contém altas quantidades destes compostos têm demonstrado significativo controle da oxidação lipídica avaliada pelo método de TBARS, quando incorporada em produtos cárneos, como o

orégano (BOTSOGLOU et al., 2003 a; FASSEAS et al., 2008), alecrim (RACANICCI et al., 2004; BRAGAGNOLO et al., 2005) e a salvia (MARIUTTI; BRAGAGNOLO., 2009; SAMPAIO et al., 2012). Com relação ao tomilho, Fratianni et al. (2010) verificaram a ação antioxidante em fatias de peito de frango submergidas em uma solução contendo 0,5 % de óleo essencial de tomilho e armazenadas a 4° C aos 0, 4, 7, 14 e 21 dias. Ensaio com peito e asa de frango marinado com uma solução de 0,05 % de uma mistura de 1:1 de óleo essencial de tomilho:laranja apresentou menor susceptibilidade a oxidação lipídica em comparação com o controle (sem a solução) durante todos os intervalos de tempo no período de 90 dias congelados (RIMINI et al., 2014). Dashti, et al. (2015) avaliaram 3 níveis de óleo essencial de tomilho na incorporação em *nuggets* de frango. Os níveis 0,1 e 0,2 % foram melhores que 0,05 % e o Controle (sem tomilho) em conter os processos oxidativos. Também, a maior dose empregada (0,2 %) teve alta aceitabilidade na análise sensorial. Esta informação é importante, visto que no presente estudo (com inclusões de BOE sendo de 70 e 140 ppm) não foi avaliada a aceitação do produto e, como sabido, os óleos essenciais exibem características organolépticas marcantes. No entanto, a prática da microencapsulação tem também como objetivo mascarar estas propriedades.

Pesquisas sobre a incorporação do óleo essencial de *O. gratissimum* na preservação de carnes e/ou embutidos não foram encontradas; tampouco do seu composto majoritário, o eugenol, para esta finalidade.

3.5. Adição da BOE na dieta de frangos de corte e efeito na estabilidade oxidativa da carne

O acúmulo dos níveis de MDA gerados pela oxidação lipídica nas almôndegas de carne de peito e de sobrecoxa mantidas sob refrigeração a 4 °C durante sete dias, estão expressos na Tabela 7. O que se pode certificar é que tanto as almôndegas de peito como as almôndegas de sobrecoxa apresentaram em todos os tratamentos um acréscimo nos valores de TBARS durante o período avaliado, o que era de se esperar. Este comportamento foi significativo em ambos os tipos de carne, independente do tratamento, e para cada dia de avaliação ($p < 0,05$), apresentando um crescimento progressivo nos dias 0, 2, 4 e 7 de, respectivamente, 0,45; 29,46; 36,42 e 51,25 $\mu\text{mol MDA} / \text{kg}$ carne de peito e de 4,82; 22,68; 47,78 e 66,09 $\mu\text{mol MDA} / \text{kg}$ carne de sobrecoxa.

O aumento da oxidação dos lipídios, expressado por maiores níveis de TBARS, está relacionado com a rancidez do produto, sendo por vezes responsável pelo sabor de

requeentado (*warmed over flavors*) que é o termo adotado para definir o rápido aumento da oxidação em produtos cárneos cozidos, caracterizado pelo sabor de ranço desenvolvido durante o armazenamento sob refrigeração (MONAHAN, 2000).

Por estes resultados, é notório que o desenvolvimento da oxidação lipídica foi mais pronunciado na carne de sobrecoxa do que na carne de peito, como ilustrado na Figura 7 e relatado anteriormente no presente estudo, quando se avaliou a incorporação dos aditivos na fabricação de almôndegas de peito e sobrecoxa (item 3.4).

Os produtos da oxidação primária, como os hidroperóxidos, são formados durante a auto-oxidação de lipídios insaturados e têm pouco ou nenhum impacto direto no odor e sabor do produto alimentar. No entanto, estes hidroperóxidos são facilmente decompostos em produtos de oxidação secundária, alguns dos quais com impacto potencialmente significativo sobre odor e sabor, produzindo o sabor requeentado (ONSEN et al., 2005 a, b). Considerando que o MDA é um dos principais produtos de decomposição dos hidroperóxidos do PUFA formados durante o processo oxidativo (OSAWA et al., 2005), estes valores podem ser explicados pela maior proporção de PUFA encontrada na carne de sobrecoxa em relação à carne de peito (CORTINAS et al., 2004). A sensibilidade destes compostos à oxidação lipídica, especialmente durante o armazenamento, é porque os ésteres que formam o PUFA são facilmente oxidados pelo oxigênio molecular, em um processo de auto-oxidação que pode ser agravada pela presença de íons de metais de transição e radicais livres (CERQUEIRA et al., 2007).

Entretanto, é possível observar que no dia 2 de armazenamento a carne de peito sofreu um maior índice de oxidação do que a carne de sobrecoxa, revelado por um maior valor de TBARS (29,46 vs 22,68). Alasnier et al (2000) verificaram esta mesma tendência entre os níveis de TBARS do peito e da coxa de frangos durante os primeiros dias de armazenamento sob refrigeração. Os autores justificaram que o peito poderia apresentar menores relações entre vitamina E:fosfolipídios e vitamina E:PUFA do que a carne da coxa. Deste modo, durante a primeira etapa de armazenamento, o *status* antioxidante dos músculos da coxa, representado por vitamina E e as enzimas antioxidantes, manteve-se eficiente para diminuir a taxa de oxidação lipídica, apesar do fato de que os músculos da coxa contêm mais agentes pró-oxidantes, como afirmado anteriormente.

Tabela 7. Efeito da inclusão de aditivos antioxidantes na dieta de frangos de corte sobre os valores de TBARS, expressos como μmol de malonaldeído (MDA)/kg carne de peito ou sobrecoxa¹.

Tratamentos	Controle	Etoxiqum	BOE70	BOE140	BOE700	Média
Dias em refrigeração		Almôndegas de peito				
0	0,45 $\pm$ 0,04 b	0,35 $\pm$ 0,02 c	0,37 $\pm$ 0,01 bc	0,77 $\pm$ 0,01 a	0,31 $\pm$ 0,02 c	0,45 D
2	25,67 $\pm$ 1,58 b	30,95 $\pm$ 1,84 ab	33,54 $\pm$ 1,13 a	28,09 $\pm$ 1,05 ab	29,05 $\pm$ 1,14 ab	29,46 C
4	32,30 $\pm$ 1,13 c	31,33 $\pm$ 0,63 c	46,42 $\pm$ 0,89 a	37,46 $\pm$ 1,47 b	34,60 $\pm$ 1,51 bc	36,42 B
7	50,63 $\pm$ 1,38 bc	47,84 $\pm$ 0,29 cd	59,99 $\pm$ 1,33 a	52,15 $\pm$ 0,88 b	45,65 $\pm$ 0,94 d	51,25 A
Média	27,26 $\pm$ 1,03 b	27,50 $\pm$ 0,70 b	35,08 $\pm$ 0,84 a	29,62 $\pm$ 0,85 b	27,40 $\pm$ 0,90 b	
Inclinação da reta²	6,75 $\pm$ 0,14 b	6,11 $\pm$ 0,08 c	8,10 $\pm$ 0,20 a	6,95 $\pm$ 0,17 b	5,97 $\pm$ 0,17 c	
Dias em refrigeração		Almôndegas de sobrecoxa				
0	4,66 $\pm$ 0,40 bc	4,61 $\pm$ 0,35 bc	3,55 $\pm$ 0,10 c	5,98 $\pm$ 0,33 a	5,02 $\pm$ 0,17 b	4,82 D
2	24,18 $\pm$ 0,27 a	23,25 $\pm$ 0,37 ab	20,68 $\pm$ 0,53 c	24,16 $\pm$ 0,86 a	21,15 $\pm$ 0,33 c	22,68 C
4	53,98 $\pm$ 1,08 a	46,28 $\pm$ 1,59 b	46,80 $\pm$ 1,09 b	51,20 $\pm$ 1,11 a	40,85 $\pm$ 0,28 c	47,78 B
7	76,32 $\pm$ 0,55 a	60,34 $\pm$ 0,72 c	67,71 $\pm$ 1,28 b	69,99 $\pm$ 0,92 b	55,78 $\pm$ 0,15 d	66,09 A
Tratamentos²	39,79 $\pm$ 0,58 a	33,70 $\pm$ 0,76 c	34,68 $\pm$ 0,75 c	37,83 $\pm$ 0,81 b	30,70 $\pm$ 0,23 d	
Inclinação da reta	10,52 $\pm$ 0,13 a	8,15 $\pm$ 0,11 c	9,41 $\pm$ 0,18 b	9,26 $\pm$ 0,11 b	7,37 $\pm$ 0,03 d	

¹ cada valor representa a média de acúmulo de MDA $\pm$ respectivo erro padrão. Controle = sem adição de aditivo; Etoxiqum = 150 ppm etoxiquim; BOE = blenda de óleos essenciais na forma microencapsulada representada pelos tratamentos: BOE70 = 70 ppm; BOE140 = 140 ppm; BOE700 = 700 ppm. a, b efeito dos tratamentos: letras minúsculas diferentes na mesma linha representam diferença estatística entre os tratamentos pelo teste de Tukey ($p < 0,05$). A, B efeito dos dias sob refrigeração: letras maiúsculas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística entre os dias pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).² inclinação da reta: média por tratamento considerando a tendência influenciada pelos dias de refrigeração.

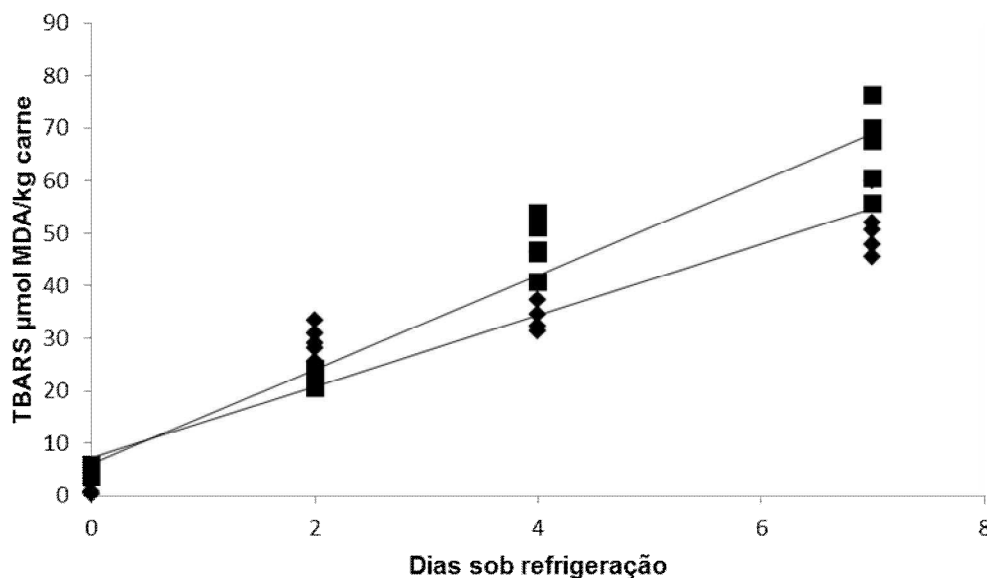


Figura 7. Efeito do período de refrigeração sobre a oxidação lipídica de almôndegas de carne de **peito** (◆) e de **sobrecoxa** (■).

Em perus, Renerre et al. (1999) descreveram uma maior atividade das enzimas antioxidantes em músculos oxidativos (perna) do que em músculos glicolíticos (peito). Assim, por ser a sobrecoxa uma área mais sensível ao processo oxidativo, os antioxidantes endógenos e exógenos parecem agir de forma mais atuante e também protetora.

A ação antioxidante dos aditivos suplementados nas dietas de frangos de corte sobre o conteúdo de MDA nas amostras de peito e de sobrecoxa no dia zero e em cada dia de armazenamento a 4 °C estão apresentados na Tabela 7 e ilustrados nas Figuras 8 (peito) e 9 (sobrecoxa). Do dia 0 ao dia 7, observou-se que o aumento de TBARS entre o Controle e os animais suplementados foi diferente e dependente do tempo, particularmente após sete dias de armazenamento. Mesmo, no geral, apresentando altos níveis de TBARS, acima de 20 μmol de malonaldeído/kg carne já no segundo dia de refrigeração, o que pode indicar uma carne rancificada (RACANICCI et al., 2004), os valores exibidos comprovam que houve uma influência significativa nos dois tipos de carne causada pela ingestão dos aditivos pelas aves ($p < 0,05$).

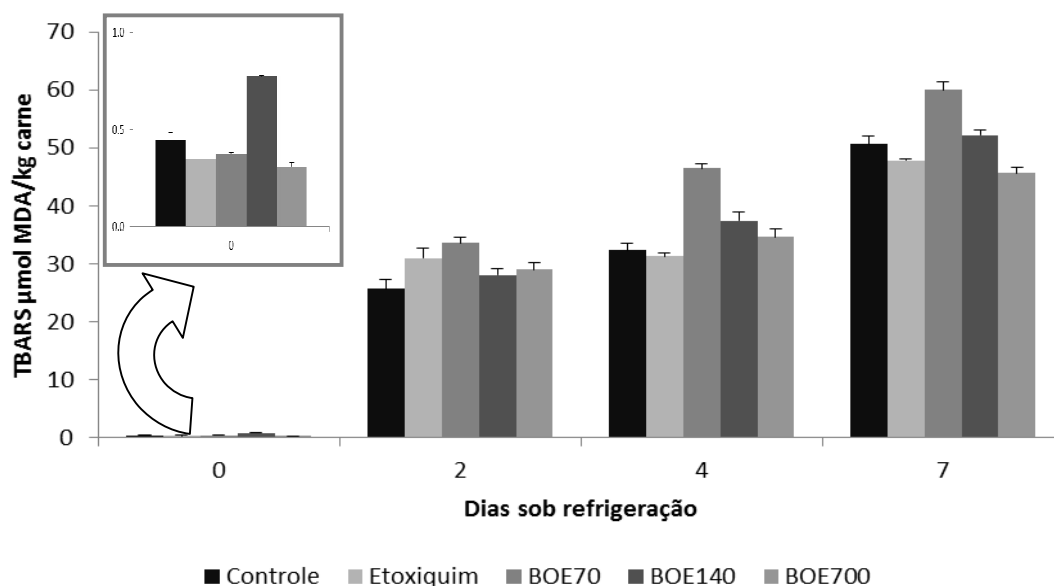


Figura 8. Efeito do período de refrigeração sobre a oxidação lipídica de almôndegas de carne de **peito** de frangos. Controle = sem adição de aditivo; Etoxiqum = 150 ppm etoxiquim; BOE = blenda de óleos essenciais na forma microencapsulada representada pelos tratamentos: BOE70 = 70 ppm; BOE140 = 140 ppm; BOE700 = 700 ppm. Cada ponto representa os valores médios de MDA e seu respectivo erro padrão.

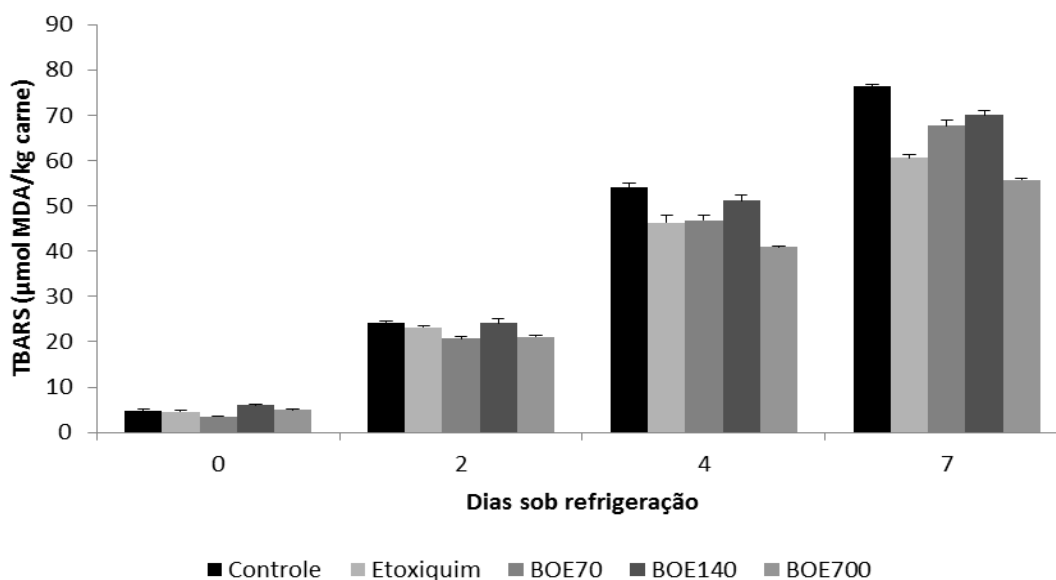


Figura 9. Efeito do período de refrigeração sobre a oxidação lipídica de almôndegas de carne de **sobrecoxa** de frangos. Controle = sem adição de aditivo; Etoxiqum = 150 ppm etoxiquim; BOE = blenda de óleos essenciais na forma microencapsulada representada pelos tratamentos: BOE70 = 70 ppm; BOE140 = 140 ppm; BOE700 = 700 ppm. Cada ponto representa os valores médios de MDA e seu respectivo erro padrão.

No dia 0 (amostras não armazenadas), o nível de TBARS já apresentou diferenças significativas entre os tratamentos avaliados nas almôndegas de carne de peito e de sobrecoxa

($p < 0,05$). Importante ressaltar que estas amostras foram trituradas e submetidas ao aquecimento térmico e estes processos influenciam de forma significativa a produção de MDA nos músculos, como observado no experimento anterior. Na carne de peito, os tratamentos com Etoxiquim e BOE na inclusão de 700 ppm apresentaram menores níveis de MDA em relação ao grupo Controle ($p < 0,05$) e, na carne de sobrecoxa, nenhum aditivo foi capaz de inibir a produção de MDA comparado ao Controle, antes do armazenamento a 4 °C.

A partir do segundo dia sob refrigeração, na comparação de médias entre as almôndegas de carne de peito, os aditivos antioxidantes não demonstraram efeitos positivos para conter os processos oxidativos em comparação à carne das aves do grupo Controle, tendo inclusive, o nível de 70 ppm da BOE apresentado pior resultado ($p < 0,05$), o que não se justifica em função dos dados gerados pelos demais níveis de inclusão. Apenas aos sete dias de refrigeração foi possível observar a diferença significativa na formação de MDA entre a carne das aves do tratamento com o mais alto nível de inclusão (BOE700) e aquela do tratamento Controle, com valores de 45,65 e 50,63, respectivamente.

Entretanto, na comparação da inclinação da reta (slope), que informa a direção geral da tendência dos dados, que quanto mais positiva, maior a inclinação da reta, a carne de peito das aves que receberam o Etoxiquim ou BOE700 nas dietas apresentou uma menor tendência de crescimento nos níveis de TBARS, do que aquelas pertencentes ao tratamento Controle, confirmando o resultado demonstrado no dia 0. Esta análise gera uma dimensão progressiva do aumento dos valores de TBARS, ou seja, o aumento da oxidação lipídica na carne, de acordo com os dias de armazenamento. Desta forma, mesmo não havendo diferenças estatísticas numéricas no período de sete dias entre os tratamentos (exceto o BOE70), a inclinação da reta do grupo Controle foi maior do que os grupos Etoxiquim e BOE700 ($p < 0,05$), supondo-se um crescimento mais pronunciado nos dias posteriores, caso fossem avaliados. Botsoglou et al. (2002 a) detectaram diferenças entre o grupo Controle e aqueles suplementados com óleo essencial de orégano ou α -tocoferol no dia 6 de refrigeração; porém, com 9 dias, o aumento de MDA na carne crua de peito do grupo Controle mais do que triplicou, enquanto nos demais foi menos do que o dobro.

Nas almôndegas de carne de sobrecoxa, o efeito da suplementação dos aditivos foi mais acentuado do que os observados nas almôndegas de peito durante o período de sete dias de armazenamento (Figura 9). A partir do dia 2 sob refrigeração, valores mais altos de MDA foram detectados na sobrecoxa de frangos do grupo Controle em comparação com os grupos suplementados. Especificamente, em 4 dias de armazenamento, o grupo Controle mostrou valores significativamente ($p < 0,05$) mais elevados de MDA do que o Etoxiquim e os grupos

suplementados com 70 e 700 ppm de BOE; tendo ainda o grupo de BOE700 apresentado o menor nível de MDA dentre aqueles suplementados ($p < 0,05$). Da mesma forma, após 7 dias de refrigeração, os valores registados em amostras da sobrecoxa do grupo Controle foram significativamente maiores ($p < 0,05$) do que aqueles encontrados nos demais grupos (Etoxiquim, BOE70, BOE140 e BOE700) suplementados nas dietas.

Na média, considerando os sete dias de armazenamento, as almôndegas de sobrecoxa provenientes das aves suplementadas com algum aditivo antioxidante apresentou menores valores de TBARS em comparação com a carne das aves do grupo sem suplementação ($p < 0,05$). Esta diferença foi mais evidente na carne das aves que ingeriram 700 ppm de BOE na ração, apresentando 77 % dos valores de oxidação gerados pelo grupo Controle. Os níveis de MDA exibidos pelas carnes das aves que receberam níveis intermediários da BOE e Etoxiquim alcançaram valores intermediários ($p < 0,05$). Com isso, a classificação entre os tratamentos de acordo com as diferenças nos níveis de TBARS no período avaliado ficou da seguinte forma: Controle > BOE140 > BOE70 = Etoxiquim > BOE700 ($p < 0,05$).

Pela análise de inclinação da reta fica demonstrado mais uma vez a maior tendência para gerar MDA na carne de sobrecoxa do grupo Controle e uma menor tendência, ou menor taxa de crescimento, para os demais grupos suplementados, especialmente o grupo com a adição de 700 ppm da BOE na dieta das aves, tendo este apresentado a menor inclinação entre todos os tratamentos suplementados ($p < 0,05$).

Avaliando os dados, a atividade antioxidante da BOE na suplementação animal apresentou eficácia semelhante, ou melhor, para retardar a oxidação de lípidios nas almôndegas de sobrecoxa do que a suplementação com o Etoxiquim. De fato, a inclusão da BOE parece demonstrar atividade antioxidante mais cedo do que o Etoxiquim, visto que aos 2 dias de armazenamento, amostras de sobrecoxas obtidas a partir das aves suplementadas com 70 ou 700 ppm de BOE apresentaram significativas diferenças em comparação com as amostras com o antioxidante sintético. Mesmo assim, os níveis de TBARS registrados nas amostras do grupo suplementado com Etoxiquim também mostraram significativa diferença em comparação com o grupo Controle a partir dos 4 dias de armazenamento. Quando o experimento foi delineado, havia dúvidas se o tratamento com a inclusão de 150 ppm de Etoxiquim poderia servir de forma efetiva como controle para conter os processos oxidativos, como registrado de forma abundante para a vitamina E. Entretanto, nossos dados concordaram com trabalhos conduzidos em épocas diferentes, mas que notaram o efeito

positivo na contenção da oxidação lipídica quando o antioxidante sintético foi adicionado na dieta de frangos de corte (BARTOV; BORNSTEIN, 1981 e LUNA et al., 2010).

Os altos níveis de MDA analisados nestas carnes indicam uma maior produção e deposição nos tecidos vivos. O consumo de dietas contendo produtos de oxidação pode prejudicar a estabilidade oxidativa da carne durante o armazenamento (RACANICCI et al., 2008, AVILA-RAMOS et al., 2012). Entretanto, as dietas utilizadas no presente estudo foram todas originadas do mesmo lote de ingredientes, inclusive o óleo de soja que foi analisado para índice de peróxidos, o que exclui o efeito na diferença de consumo por alimentos oxidados. Também, uma preocupação que foi descartada, era que níveis elevados da BOE na dieta das aves pudessem comprometer a ingestão da ração e interferir, de alguma forma, na ação dos óleos essenciais no organismo animal. No entanto, como demonstrado anteriormente, o consumo de ração foi significativamente igual entre os tratamentos avaliados.

Na nossa suposição e com base nos dados obtidos, toda ação antioxidante observada através da inclusão dos aditivos nas dietas das aves são possivelmente pela transferência de seus constituintes ao organismo, inibindo nos tecidos as reações envolvidas na oxidação lipídica (FLOROU-PANERI et al., 2005). As diferenças observadas entre os aditivos e o grupo Controle fornecem evidências indiretas de que estes antioxidantes podem ser absorvidos e entrar no sistema circulatório sistêmico, após a ingestão através da dieta (BOTSOGLOU et al., 2002 a; LUNA et al., 2010). Resultados nesta mesma linha de investigação foram confirmados por outros autores, justificando as respostas na estabilidade oxidativa da carne como um efeito da sua incorporação, através da inclusão de aditivos antioxidantes nas dietas de frangos de corte. Dentre os aditivos naturais avaliados, o óregano na forma de extrato ou óleo essencial é a especiaria que dispõe do maior número de verificação e comprovação deste efeito em trabalhos conduzidos por Botsoglou et al. (2002 a, b; 2003 b), Florou-Paneri et al. (2005), Govaris et al. (2005) e Avila-Ramos et al. (2012).

Recentemente, Luna et al. (2010) suplementaram os frangos de corte com dietas contendo 150 ppm de BHT ou de carvacrol ou de timol e concluíram que os aditivos naturais foram mais eficientes em controlar a peroxidação do que o grupo Controle e BHT, sendo este efeito mais nítido na carne de coxa do que na de peito, concordando com nossos resultados. Similarmente, Bölükbase et al. (2006) avaliando o óleo de tomilho na inclusão de 100 e 200 ppm nas dietas de frangos de corte, detectaram diferenças significativas na estabilidade oxidativa da carne de pernas e peito das aves destes tratamentos em relação ao Controle,

inclusive com melhores resultados para as dietas suplementadas com vitamina E na mesma dosagem.

De acordo com comprovações *in vitro*, a atuação antioxidante dos compostos presentes nos óleos investigados como o timol, carvacrol e eugenol ocorre no nível da membrana celular. Ogata et al. (2000) e Nagababu et al. (2010) comprovaram que o eugenol é incorporado na membrana mitocondrial e inibe a peroxidação lipídica através da captura de espécies de oxigênio ativas e da quebra da reação em cadeia dos radicais livres. Também há evidências da atuação do timol e carvacrol nos radicais hidroxil na membrana celular, tornando – os produtos estáveis e impedindo o processo de oxidação (YANISHLIEVA et al., 1999). Entretanto, a disponibilidade destes compostos e seus metabólitos nos respectivos órgãos-alvo é difícil de serem comprovadas; sendo necessária a investigação da absorção, distribuição, metabolismo e excreção para proporcionar a ligação entre os efeitos dos estudos *in vitro* e *in vivo* (KOHLERT et al., 2002).

Mesmo a literatura atestando que o acúmulo dos óleos essenciais e seus constituintes nos tecidos sejam pouco prováveis, uma vez que há uma rápida conversão metabólica e excreção, como demonstrado para a molécula de eugenol em humanos (FISHER et al., 1990) e de timol e carvacrol em ratos (AUSTGULEN et al., 1987); estudos demonstram que a suplementação dietética com óleo essencial de tomilho protege e mantém os níveis de PUFA em membranas celulares do fígado (DEANS, et al., 1993) e cérebro de ratos (YOUDIM; DEANS, 2000), exercendo um efeito anitoxidante.

Também, há suposições de que os constituintes dos óleos essenciais possam de fato alcançar os tecidos. Haselmeyer et al. (2015) avaliaram níveis crescentes (0,1; 0,2; 0,3 e 1,0 % p:p) de inclusão de tomilho (folhas e flores em pó contendo 1,4 % de óleo essencial com 58 % de timol) nas dietas de frangos de corte durante 35 dias. Os autores detectaram a molécula de timol no conteúdo do intestino e plasma, em que o grupo que recebeu 1 % de tomilho na dieta apresentou maiores concentrações de timol do que os demais grupos ($p < 0,05$). Nos tecidos comestíveis, como fígado e músculo, os níveis de timol encontrados foram muito baixos, estando perto do limite de quantificação, mas foi verificado que a molécula estava presente.

Além do mais, Hashemipour et al. (2013) investigando o efeito de níveis (0, 60, 100, e 200 mg/kg na dieta) de uma blenda 1:1 de timol:carvacrol constataram um aumento linear da atividade das enzimas superóxido dismutase e glutathione peroxidase no músculo da coxa de frangos de corte aos 42 dias e no soro e fígado aos 24 e 42 dias, respectivamente. Esta pode ser uma das ações dos óleos essenciais no organismo para conter os processos oxidativos

da carne, pois de acordo com Maraschiello et al. (1999) existe uma alta correlação entre o nível de glutathione peroxidase e TBARS, podendo esta enzima ser utilizada como um indicador da estabilidade oxidativa na carne.

No presente trabalho foi feita a tentativa de avaliar a presença dos compostos dos óleos essenciais na carne de sobrecoxa crua dos frangos alimentados com a maior quantidade de BOE (700 ppm). Porém, não foi possível detectar os espectros relacionados através da cromatografia de alta eficiência (CLAE), pois, como observado no trabalho de Haselmeyer et al. (2015), poderiam estar abaixo do limite de quantificação.

Com base nestes argumentos, percebe-se que esta é uma área de pesquisa que necessita de mais estudos para elucidar a ação das moléculas no organismo do animal e seus reais efeitos na qualidade da carne. Também, pelas diferenças nas metodologias de TBARS aplicadas e pela forma de apresentação dos dados, fica difícil uma comparação entre as pesquisas. A realização de uma análise sensorial seria um complemento útil na elucidação da aceitação das carnes no decorrer do período de armazenamento, uma vez que há poucos dados disponíveis na literatura, principalmente pelas diferenças na quantificação do TBARS.

No entanto, foi possível afirmar que existe uma preservação do estado oxidativo, sendo os aditivos antioxidantes mais eficientes do que o grupo Controle, efeito este notado especialmente na carne de sobrecoxa. A partir de seus estudos, Botsoglou et al. (2002 a; 2003 b) sugeriram que a deposição de OE nos tecidos de frangos de corte seja dose-dependente, ou seja, quanto maior a inclusão e maior o tempo de consumo, mais evidentes serão os resultados. Esta observação, com relação à dose de inclusão, foi confirmada no presente trabalho, uma vez que o tempo de consumo foi igual para todos os tratamentos. Claramente o nível de 700 ppm de inclusão da BOE na dieta das aves demonstrou uma ação na estabilidade oxidativa da carne de peito e, principalmente na de sobrecoxa, de forma mais notória do que os menores níveis de inclusão da BOE e/ou antioxidante sintético.

3.6. Perfil de ácidos graxos das carnes de aves alimentadas com diferentes tratamentos

As propriedades bromatológicas e perfil de ácidos graxos das almôndegas de peito e de sobrecoxa estão apresentadas na Tabela 8. Esta avaliação visou apenas uma caracterização das almôndegas, visto que não foi aplicada a análise estatística.

Fica claro, como era de se esperar, que o conteúdo de extrato etéreo (gordura) da carne de sobrecoxa é maior do que aquele presente no peito, sendo superior em 2,5 vezes (4,5 % vs 1,7 %, respectivamente).

Observando os dados sobre o perfil de ácidos graxos, é possível fazer algumas inferências. O maior nível de inclusão da BOE (700 ppm) na dieta promoveu um discreto aumento nos níveis de PUFA, principalmente com relação ao grupo Controle, sendo de, aproximadamente 8 e 10 % para o peito e sobrecoxa, respectivamente. Como efeito, este aumento, proporcionou uma melhor relação PUFA:gordura saturada em ambos os tipos de carne. Em termos de saúde humana, a composição de ácidos graxos dos produtos cárneos é um parâmetro importante da qualidade da carne. Segundo Wood; Enser (1997), para que esta relação seja considerada saudável, deve ser superior a 0,45, estando todos os tratamentos com níveis superiores a 0,60, que é o esperado para a carne de coxa e sobrecoxa de frango (HAUTRIVE et al., 2012).

Também, a quantidade de ômega 3 e ômega 6 das almôndegas do grupo de 3500 ppm foram maiores em relação aos demais tratamentos. No entanto, os valores de ômega 3 de todos os tratamentos foram bem superiores aos de 0,93 analisados por Hautrive et al. (2012), para a carne de coxa e sobrecoxa de frango de corte.

Estes resultados discordam daqueles analisados por Bölükbase et al. (2006), que suplementaram a dieta de frangos de corte com 100 e 200 ppm de óleo de tomilho e notaram uma redução significativa nas concentrações de ácidos graxos saturados e PUFA e um aumento nos níveis de mono-insaturados (MUFA) na carne das pernas e de peito das aves que consumiram estas dietas. Por outro lado, Hashemipour et al. (2013) encontraram uma relação linear significativa entre o aumento dos níveis de inclusão de timol:carvacrol nas dietas das aves com o aumento nos níveis de PUFA e a diminuição nos níveis de ácidos graxos saturados na carne de coxa. Os pesquisadores justificaram que houve uma ação antioxidante das moléculas de timol e carvacrol o que bloqueou a peroxidação lipídica das gorduras da coxa, especialmente o PUFA, que é mais sensível à oxidação. Estes resultados justificam aqueles encontrados no presente trabalho, uma vez que o nível de inclusão de 700 ppm da BOE, que é rica em timol e carvacrol, e que apresentou o maior valor de PUFA, apresentou também um resultado consistente no controle da peroxidação lipídica nas almôndegas de peito e de sobrecoxa.

De acordo com o ineditismo dos dados apresentados no controle da oxidação lipídica, uma vez que não há relatos de pesquisas sobre micropartículas de OE adicionadas na fabricação de produtos cárneos, ou desta blenda na dieta das aves, este aditivo foi patenteadado.

Tabela 8. Efeito da inclusão de aditivos antioxidantes na dieta sobre a composição de ácidos graxos mono e poli-insaturados da carne de peito e sobrecoxa de frangos de corte (35 d) após o aquecimento térmico.

		Peito					Sobrecoxa				
		Controle	Etoxiqum	BOE70	BOE140	BOE700	Controle	Etoxiqum	BOE70	BOE140	BOE700
Matéria Seca (MS)	%	30,57	30,21	30,44	30,46	30,51	28,65	28,52	27,33	28,99	28,16
Extrato Etéreo (EE)	%	1,47	1,53	2,16	1,79	1,77	4,43	4,56	4,51	4,83	4,23
Ácidos graxos (% EE)											
MUFA	%	39,42	39,64	42,47	38,68	38,37	46,43	45,77	45,96	46,66	44,19
PUFA	%	25,44	23,47	24,30	23,52	27,52	20,94	21,84	22,34	20,87	22,99
Gorduras Insaturadas	%	64,86	63,11	66,77	62,20	65,89	67,38	67,61	68,30	67,53	67,18
Gorduras Saturadas	%	35,14	36,72	33,22	32,14	34,11	32,59	32,37	31,68	32,46	32,82
PUFA:Saturada		0,72	0,64	0,73	0,73	0,81	0,64	0,67	0,71	0,64	0,70
Gorduras Trans											
(C18:1n9t)	%	0,17	0,11	0,16	0,14	0,06	0,07	0,09	0,09	0,10	0,07
Ômega 3	%	1,64	1,68	1,52	1,46	1,80	1,06	1,07	1,17	1,13	1,47
Ômega 6	%	24,65	22,47	23,64	20,98	26,48	20,16	21,10	21,55	20,09	21,97
Ômega 9	%	32,60	32,74	35,56	34,18	31,82	38,09	37,21	38,16	38,24	35,81

Controle = sem adição de aditivo; Etoxiqum = 150 ppm etoxiquim; BOE = blenda de óleos essenciais na forma microencapsulada representada pelos tratamentos: BOE70 = 70 ppm; BOE140 = 140 ppm; BOE700 = 700 ppm. MUFA: C14:1, C16:1, C18:1 ω 9t, C18:1 ω 9c, C20:1 ω 9, C20:3 ω 6, C24:1 ω 9. PUFA: C18:2 ω 6c, C18:3 ω 6, C18:3 ω 3, C20:2, C20:4 ω 6, C20:3 ω 3, C22:1 ω 9, C20:5 ω 3, C22:6 ω 3 (DHA). Gorduras saturadas: C12:0, C14:0, C15:0, C16:0, C17:0, C18:0, C20:0, C22:0, C24:0. Ômega 3: C18:3 ω 3, C20:3 ω 3, C20:5 ω 3, C22:6 ω 3. Ômega 6: C18:2 ω 6c, C18:3 ω 6, C20:3 ω 6, C20:4 ω 6. Ômega 9: C18:1 ω 9t, C18:1 ω 9c, C20:1 ω 9, C22:1 ω 9, C24:1 ω 9.

4. Conclusões

A blenda 1:3 de óleos essenciais de *T. vulgaris*:*O. gratissimum* na forma de micropartículas pode ser utilizada como aditivo antioxidante natural na formulação de produtos cárneos e igualmente na dietas de frangos de corte.

O nível de 70 e 140 ppm da BOE na incorporação das almôndegas de peito e de sobrecoxa, respectivamente, foram capazes de conter os processos oxidativos causados pelo aquecimento, além de 140 ppm ser mais eficiente que o antioxidante sintético (BHT) nas almôndegas de sobrecoxa pré-cozidas.

A inclusão da blenda de óleos essenciais na dieta de frangos de corte não prejudicou o consumo, além disso, a ingestão de dietas com 700 ppm da BOE pelas aves tem efeito na estabilidade oxidativa, principalmente da carne de sobrecoxa pré-cozida e armazenada a 4 °C, sendo inclusive mais ativa do que o antioxidante sintético (Etoxiquim).

5. Referências

- ALASNIER, C. et al. Hydrolytic and oxidative changes in the lipids of chicken breast and thigh muscles during refrigerated storage. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 1, p. 9-14, 2000.
- ALI, A. S. A.; HARRISON, A. P.; JENSEN, J. F. Effects of some ante-mortem stressors on peri-mortem and postmortem biochemical changes and tenderness in broiler breast muscle: A review. **World's Poultry Science Journal**, v. 55, p.403–414, 1999.
- ALLEN, C. D. et al. The relationship of broiler breast color to meat quality and shelf-life. **Poultry Science**, v. 77, n. 2, p. 361-366, 1998.
- AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 18.ed. Washington: AOAC, 2007. 3000p.
- AUSTGULEN, Liv-Torill; SOLHEIM, Einar; SCHELIN, Ronald R. Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 61, n. 2, p. 98-102, 1987.

- AVILA-RAMOS, F.; et al. Effects of dietary oregano essential oil and vitamin E on the lipid oxidation stability of cooked chicken breast meat. *Poultry Science*, v. 91, p. 505-511.
- BAKKALI, F, et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BAKOWSKA-BARCZAK, Anna M.; KOŁODZIEJCZYK, Paul P. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 2, p. 1301-1309, 2011.
- BARTOV, I.; BORNSTEIN, S. Stability of abdominal fat and meat of broilers: Combined effect of dietary vitamin E and synthetic antioxidants. **Poultry Science**, v. 60, n. 8, p. 1840-1845, 1981.
- BENTAYEB, Karim et al. The additive properties of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay: The case of essential oils. **Food chemistry**, v. 148, p. 204-208, 2014.
- BLIGH, E. Graham; DYER, W. Justin. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BOTSOGLU, N. A. et al. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 62, n. 2, p. 259-265, 2002 a.
- BOTSOGLU, N. A., et al.. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. **British Poultry Science.**, v. 43, p. 223–230, 2002 b.
- BOTSOGLU, N. A. et al. The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 65, n. 3, p. 1193-1200, 2003 a.
- BOTSOGLU, N. A. et al. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation. **Food Research International**, v. 36, n. 3, p. 207-213, 2003 b.

- BOLUKBASI, S. C.; ERHAN, M. K.; OZKAN, A. Effect of dietary thyme oil and vitamin E on growth, lipid oxidation, meat fatty acid composition and serum lipoproteins of broilers. **South African Journal of Animal Science**, v. 36, n. 3, p. 189-196, 2006.
- BOZIN, Biljana et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1822-1828, 2006.
- BRAGAGNOLO, Neura; DANIELSEN, Bente; SKIBSTED, Leif H. Effect of rosemary on lipid oxidation in pressure-processed, minced chicken breast during refrigerated storage and subsequent heat treatment. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 5, p. 610-615, 2005.
- BRASIL FOOD TRENDS 2020.2012. Disponível em <<http://www.brasilfoodtrends.com.br/publicacao.html>>. Acesso em 15 de setembro de 2015.
- BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- BUSATTA, C. et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food microbiology**, v. 25, n. 1, p. 207-211, 2008.
- CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology Medicine**, v.14, p. 303-311, 1993.
- CERQUEIRA, Fernanda Menezes; DE MEDEIROS, Marisa Helena Gennari; AUGUSTO, Ohara. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441, 2007.
- CHARLES, Denys J.; SIMON, James E. A new geraniol chemotype of *Ocimum gratissimum* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 4, n. 3, p. 231-234, 1992.
- CORTINAS, L.; et al. Influence of the Dietary Poly-unsaturation Level on Chicken Meat Quality: Lipid Oxidation. **Poultry Science**, v.84, p.48-55, 2005.

- DASHTI, Neda Ganjali et al. Antioxidant Effect of Thyme Essential Oil on Oxidative Stability of Chicken Nuggets. **International Journal of Food Engineering**, v. 1, n. 2, 2015.
- DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48–54, 2004.
- DAWIDOWICZ, Andrzej L.; OLSZOWY, Małgorzata. Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. **Natural product research**, v. 28, n. 22, p. 1952-1963, 2014.
- DEANS, S.G.; et al. Promotional effects of plant volatile oils on the polyunsaturated fatty acid status during aging. **Journal Essential Oil Research**, v. 16, p.71–74, 1993.
- DE VOS, Paul et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010.
- DORMAN, H. J. D.; SURAI, P.; DEANS, S. G. *In vitro* antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. **Journal Essential Oil Research**, v. 12, p.241–248, 2000.
- DUDONNÉ, S.; et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1768–1774, 2009.
- ESTÉVEZ, Mario; CAVA, Ramón. Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different types of frankfurters. **Meat Science**, v. 72, n. 2, p. 348-355, 2006.
- FAO.<http://www.faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/go/download/O/OA/E>. Acesso em: 20/11/2013.
- FASSEAS, M. K. et al. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 1188-1194, 2008.

- FISCHER, I. U.; VON UNRUH, G. E.; DENGLER, H. J. The metabolism of eugenol in man. **Xenobiotica**, v. 20, n. 2, p. 209-222, 1990.
- FLETCHER, D. L. Poultry meat quality. **World's Poultry Science Journal**, v. 58, n. 02, p. 131-145, 2002.
- FLOROU-PANERI, P. et al. Oregano herb versus oregano essential oil as feed supplements to increase the oxidative stability of turkey meat. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 11, p. 866-871, 2005.
- FRATIANNI, Florinda et al. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. **Journal of food science**, v. 75, n. 8, p. M528-M535, 2010.
- GOVARIS, A. et al. Dietary supplementation of oregano essential oil and-tocopheryl acetate on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during storage. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 12, p. 969-975, 2005.
- HASELMEYER, Alexander; ZENTEK, Jürgen; CHIZZOLA, Remigius. Effects of thyme as a feed additive in broiler chickens on thymol in gut contents, blood plasma, liver and muscle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 3, p. 504-508, 2015.
- HASHEMIPOUR, Hamideh et al. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. **Poultry science**, v. 92, n. 8, p. 2059-2069, 2013.
- HAUTRIVE, Tiffany Prokopp et al. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, COLESTEROL E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE CORTES CÁRNEOS COMERCIAIS DE AVESTRUZ, SUÍNO, BOVINO E FRANGO. **Brazilian Journal of Food & Nutrition/Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 2, 2012.
- HERNANDEZ, F. et al. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. **Poultry science**, v. 83, n. 2, p. 169-174, 2004.

- HOFFMAN-PENNESI, D.; WU, C. The effect of thymol and thyme oil feed supplementation on growth performance, serum antioxidant levels, and cecal *Salmonella* population in broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 19(4), p. 432-443, 2010.
- IAL- Instituto Adolfo Lutz. (2008). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análises de alimentos. (4ª ed., 1ª ed. digital). São Paulo.
- JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. Hepatoprotective effect of thymol on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. **Pak J Biol Sci**, v. 6, n. 5, p. 448-451, 2003.
- KÄHKÖNEN, Marja P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.
- KATSUBE, T.; et al. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay and Folin-Ciocalteu assay. *Journal of the Agricultural and Food Chemistry*, v. 52, p. 2391-2396, 2004.
- KOHLERT, C. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. **Planta medica**, v. 66, n. 06, p. 495-505, 2000.
- KHATTAK, F. et al. Effects of natural blend of essential oil on growth performance, blood biochemistry, cecal morphology, and carcass quality of broiler chickens. **Poultry science**, v. 93, n. 1, p. 132-137, 2014.
- KRANEN, R. W. et al. Hemoglobin and myoglobin content in muscles of broiler chickens. **Poultry science**, v. 78, n. 3, p. 467-476, 1999.
- KRISHNAIAH, Duduku; SARBATLY, Rosalam; NITHYANANDAM, Rajesh. Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. **Chemical engineering research and design**, v. 90, n. 5, p. 622-632, 2012.
- LANARI, M. C. et al. Effect of dietary tocopherols and tocotrienols on the antioxidant status and lipid stability of chicken. **Meat science**, v. 68, n. 2, p. 155-162, 2004.

- LANGER, Roselane Oliveira de Souza et al. Broiler transportation conditions in a Brazilian commercial line and the occurrence of breast PSE (Pale, Soft, Exudative) meat and DFD-like (Dark, Firm, Dry) meat. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1161-1167, 2010.
- LEE, K. W. et al. Cinnamaldehyde, but not thymol, counteracts the carboxymethyl cellulose-induced growth depression in female broiler chickens. **Int. J. Poult. Sci**, v. 3, n. 9, p. 608-612, 2004.
- LEE, S.J.; et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, p. 131-137, 2005.
- LESIÓW, Tomasz; KIJOWSKI, Jacek. Impact of PSE and DFD meat on poultry processing-a review. **Polish journal of food and nutrition sciences**, v. 12, n.2, p. 3-8, 2003.
- LUNA, A.; et al. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. **Poultry Science**, v.89, p.366-370, 2010.
- MARASCHIELLO, C.; SÁRRAGA, C.; GARCIA REGUEIRO, J. A. Glutathione peroxidase activity, TBARS, and α -tocopherol in meat from chickens fed different diets. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 867-872, 1999.
- MARIUTTI, Lilian Regina Barros; BRAGAGNOLO, Neura. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 68, n. 1, p. 1-11, 2009.
- MATHEW, Sindhu; ABRAHAM, T. Emilia. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various *in vitro* models. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 520-528, 2006.
- MATHIAS, Simone Pereira et al. Alterações oxidativas (cor e lipídios) em presunto de peru tratado por Alta Pressão Hidrostática (APH). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 852-857, 2010.
- MIN, B; AHN, D. U. Mechanism of Lipid Peroxidation in meat and meat products -A Review. **Food Science Biotechnology**, v. 14, p. 152-163, 2005.

- MITSUMOTO, M., et al. Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. **Meat Science**, v. 69:4, p. 773-779, 2005.
- MONAHAN, FRANK J. Oxidation of lipids in muscle foods: fundamental and applied concerns. **Antioxidants in muscle foods. Nutritional strategies to improve quality**, p. 3-23, 2000.
- MORRISSEY, P. A.; et al. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, v. 49 (1), p.s73-s86, 1998.
- NAGABABU, E.; SESIKERAN, B.; LAKSHMAIAH, N. The protective effects of eugenol on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. **Free radical research**, v. 23, n. 6, p. 617-627, 1995.
- NAGABABU, Enika et al. Assessment of antioxidant activity of eugenol *in vitro* and *in vivo*. **Free Radicals and Antioxidant Protocols**, p. 165-180, 2010.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient Requirements of Poultry. Washington, D.C. 1994. 155p.
- NUNES, Graciele Lorenzoni et al. Microencapsulation of freeze concentrated Ilex paraguariensis extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60-68, 2015.
- OGATA, Masahiro; HOSHI, Midori; URANO, Shiro. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 10, p. 1467-1469, 2000.
- OSAWA, Cibele Cristina; DE FELÍCIO, Pedro Eduardo; GONÇALVES, Lireny Ap Guaraldo. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655, 2005.
- OLSEN, Elisabeth et al. Analysis of the early stages of lipid oxidation in freeze-stored pork back fat and mechanically recovered poultry meat. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 2, p. 338-348, 2005 a.

- OLSEN, Elisabeth et al. Analysis of early lipid oxidation in smoked, comminuted pork or poultry sausages with spices. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 19, p. 7448-7457, 2005 b.
- PANDEY, Abhay Kumar; SINGH, Pooja; TRIPATHI, Nijendra Nath. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 9, p. 682-694, 2014.
- PANG, Sook Fun; YUSOFF, Mashitah M.; GIMBUN, Jolius. Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 159-165, 2014.
- PRABHU, K. S.; et al. *Ocimum gratissimum*: A review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. **The Open Complementary Medicine Journal**, v. 1, p. 1-15, 2009.
- QIAO, M. et al. The effect of broiler breast meat color on pH, moisture, water-holding capacity, and emulsification capacity. **Poultry Science**, v. 80, n. 5, p. 676-680, 2001.
- RACANICCI, Aline MC et al. Antioxidant effect of dittany (*Origanum dictamnus*) in pre-cooked chicken meat balls during chill-storage in comparison to rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 6, p. 521-524, 2004.
- RACANICCI, Aline MC; DANIELSEN, Bente; SKIBSTED, Leif H. Mate (*Ilex paraguariensis*) as a source of water extractable antioxidant for use in chicken meat. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 1, p. 255-260, 2008.
- RACANICCI, Aline MC et al. Mate (*Ilex paraguariensis*) as dietary additive for broilers: performance and oxidative stability of meat. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 4, p. 655-661, 2011.
- RENERRE, Michel et al. Influence of dietary fat and vitamin E on antioxidant status of muscles of turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 237-244, 1999.

- RHEE, K. S. et al. Fatty acid profiles of the total lipids and lipid oxidation in pork muscles as affected by canola oil in the animal diet and muscle location. **Meat Science**, v. 23, n. 3, p. 201-210, 1988.
- RHEE, K. S.; ANDERSON, L. M.; SAMS, A. R. Lipid oxidation potential of beef, chicken, and pork. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 1, p. 8-12, 1996.
- RICE-EVANS, Catherine A.; MILLER, Nicholas J.; PAGANGA, George. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.
- RIMINI, Simone; PETRACCI, Massimiliano; SMITH, Douglas P. The use of thyme and orange essential oils blend to improve quality traits of marinated chicken meat. **Poultry science**, p. PS3601, 2014.
- ROBERT, Paz et al. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. **International journal of food science & technology**, v. 45, n. 7, p. 1386-1394, 2010.
- ROBEY, W.; SHERMER, W. The damaging effects of oxidation. *Feed Mix*, v.2, n.5, p.22-26, 1994.
- SACCHETTI, Gianni et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.
- SAMPAIO, G. R. et al. Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1383-1390, 2012.
- SCOTT, M.L.; et al. Nutrition of the chicken. 3ª edição. Ithaca: M. L. SCOTT & Associates, 1982, 562p.
- SHAN, Bin et al. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7749-7759, 2005.
- SHEEHY, P. J. A.; MORRISSEY, P. A.; FLYNN, A. Influence of heated vegetable oils and α -tocopheryl acetate supplementation on α -tocopherol, fatty acids and lipid peroxidation in chicken muscle. **British poultry science**, v. 34, n. 2, p. 367-381, 1993.

SIMON, James E. et al. Basil: a source of essential oils. **Advances in new crops**, p. 484-489, 1999.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMMELA-RANVENSON, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.

SIU, G. M.; DRAPER, H. H. A survey of the malonaldehyde content of retail meats and fish. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 4, p. 1147-1149, 1978.

SELANI, M. M. et al. Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. **Meat science**, v. 88, n. 3, p. 397-403, 2011.

SOLADOYE, O. P. et al. Protein oxidation in processed meat: Mechanisms and potential implications on human health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 2, p. 106-122, 2015.

SOUSA, CM de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SØRENSEN, G.; JØRGENSEN, S. S. A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, v. 202, p. 205-210, 1996.

SWANSON, Katherine MJ et al. Oil-and Fat-Based Foods. In: **Microorganisms in Foods 8**. Springer US, 2011. p. 247-261.

TANG, Shuze et al. Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. **Food Research International**, v. 34, n. 8, p. 651-657, 2001.

TIIHONEN, Kirsti et al. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. **British poultry science**, v. 51, n. 3, p. 381-392, 2010.

- WANG, Yu et al. Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 3, p. 391-396, 2009.
- WEI, A; SHIBAMOTO, T. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p. 7218-7225, 2010.
- WOJDYŁO, A.; OSZMIAN'SKI, J.; CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, p. 940-949, 2007.
- WONG, Jon W.; HASHIMOTO, Kelly; SHIBAMOTO, Takayuki. Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model meat system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 2707-2712, 1995.
- WOOD, J. D. et al. Effects of fatty acids on meat quality: a review. **Meat science**, v. 66, n. 1, p. 21-32, 2004.
- WOOD, J. D.; ENSER, M. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. **British Journal of Nutrition**, v. 78, n. 01, p. S49-S60, 1997.
- WU, Yuanfeng et al. Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. **Carbohydrate polymers**, v. 102, p. 497-503, 2014.
- YANISHLIEVA, Nedyalka V. et al. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 59-66, 1999.
- YANISHLIEVA, Nedyalka V.; MARINOVA, Emma; POKORNÝ, Jan. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 9, p. 776-793, 2006.
- YODIM, K. A.; DEANS, S. G. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the aging rat brain. **British Journal Nutrition**, v. 83, p. 87-93, 2000.
- ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 5165-5170, 2001.

- CAPÍTULO 5 -

DISCUSSÃO GERAL

Os estudos com óleos essenciais são documentados há muito tempo pela medicina popular. São substâncias que contem grande diversidade de grupos em sua composição, pois um mesmo óleo essencial pode ter mais de um mecanismo de ação com função antimicrobiana, antifúngica, antioxidante, dentre outras (BURT, 2004). E este benefício da pluralidade na constituição dos óleos, torna-se uma adversidade quando se objetiva a padronização de um produto comercial. Desta forma, quando decidimos pela pesquisa com os óleos essenciais, partimos do pressuposto que um óleo ou uma mistura de óleos atenderia mais de um tipo de aplicação e, a determinação da composição química e da quantificação dos compostos majoritários seria indispensável para a padronização do produto final. Com efeito, a diversidade do perfil em número e quantidade de compostos é claramente influenciada pelas estações do ano, assim como comprovado no Capítulo 3. Quando se comparou os óleos essenciais das espécies de *T. vulgaris* e *O. gratissimum* colhidos em diferentes épocas ao longo do ano, além de óleos destas mesmas espécies obtidos comercialmente, o perfil bioquímico se mostrou variado entre as amostras, entretanto, os compostos majoritários permaneceram como tais, sendo parâmetro para padronização.

Os resultados de atividade antimicrobiana (expresso como Concentração Inibitória Mínima, comumente denominada de MIC) revelados no Capítulo 3 foram outro fator que claramente demonstrou como a variação química do mesmo óleo essencial pode influenciar sua atividade frente a diferentes cepas de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. O *T. vulgaris* apresentou melhor ação anti-*Salmonella* do que o *O. gratissimum*, sendo, logo, uma melhor opção. No entanto, de acordo com a experiência do grupo de pesquisas do CPQBA, apoiada em trabalhos anteriores (SARTORATO et al., 2004), a produção de óleo, ou seja, a produtividade do *O. gratissimum* é superior ao do *T. vulgaris*. Novamente, considerando a concepção de um produto comercial e o que seria um bom custo-benefício, foi proposta a blenda na proporção 1:3 (*T. vulgaris*:*O. gratissimum*), uma vez que os resultados de atividade antimicrobiana obtidos com os óleos comerciais foram satisfatórias. Esta resposta definiu a padronização do produto, constando de 1 parte da soma dos compostos timol+carvacrol e 3 partes do composto eugenol, estabelecido para servir de referência em estudos posteriores. Também, a partir destes estudos, foi determinado o valor de MIC para a blenda de óleos essenciais (BOE) de 700 µg/mL, sendo este o número que orientou os níveis estabelecidos nos ensaios com frangos de corte.

A *Salmonella enterica* é comumente adquirida a partir de alimentos contaminados e é uma importante causa de doença em todo o mundo, sendo os sorovares Enteritidis e Typhimurium os predominantes (HENDRIKSEN et al., 2011). Consistindo o frango de corte uma possível fonte de contaminação, toda e qualquer intervenção que resulte em um controle na disseminação da *Salmonella* na cadeia avícola deve ser considerada. Com base neste argumento, elaboramos a hipótese de que a inclusão de óleos essenciais na dieta de frangos de corte atuaria diminuindo a colonização de *Salmonella* no ceco das aves. Primeiramente, a determinação *in vitro* da cinética de crescimento de *S. Enteritis* MB089-R (resistente à rifamicina, 64 µg/mL) dos níveis de 0, 70, 140 e 700 µg/mL de BOE, constatou serem estes níveis eficientes em diminuir a taxa de crescimento bacteriano. Assim, com os resultados, pode-se observar também que não só o nível determinado como MIC inibiu o crescimento da *Salmonella*, mas também as doses inferiores (70 e 140 µg/mL) de BOE, motivando sua utilização nos experimentos com frangos de corte. Menores inclusões de aditivos nas dietas de frangos de corte se tornam uma opção mais viável, uma vez que estas dietas são compostas por vários ingredientes e o espaço de formulação é restrito.

O processo de microencapsulação da BOE, como descrito no Apêndice 2, demonstrou uma boa eficiência de retenção dos óleos essenciais, embora tenha sido constatado uma maior quantidade da BOE na parte externa da microcápsula. A escolha de um material de parede de baixo custo, no caso a maltodextrina, teve grande influência neste resultado. Também, embora a retenção tenha sido próxima ao esperado (20% de BOE) esta ainda é uma quantidade baixa, sendo recomendados mais estudos com este composto para otimização do produto final, o que proporcionará menores inclusões em formulações alimentícias.

Com esta porcentagem de retenção (20% de BOE) os níveis de adição estudados na forma microencapsulada foram de 350, 700 e 3500 ppm, correspondendo a 70, 140 e 700 ppm da BOE, ou seja, os mesmos níveis que foram avaliados *in vitro*. Estes níveis foram examinados quanto à aceitação pelos frangos de corte através da avaliação do seu desempenho, não havendo diferenças entre os tratamentos. Era importante que não houvessem alterações de consumo pelas aves entre as dietas com diferentes nível de BOE, pois este fator poderia interferir na avaliação da ação anti-*Salmonella* no ceco das aves e também na ação antioxidante no músculo dos animais.

Com base na atividade antimicrobiana *in vitro*, é coerente considerar a aplicação de óleos essenciais como agentes profiláticos na produção animal. Espera-se que a ingestão de óleos essenciais afete a composição e a população da microbiota gastrintestinal (LEE et al., 2003). O ceco de frangos representa o principal local de colonização para *S. Enteritidis* (KOLLANOOR JOHNY et al., 2009), permitindo assim uma maior disseminação da infecção para aves saudáveis, através das excretas no ambiente e também durante o abate. Portanto, esta etapa do nosso estudo foi para avaliar a redução da população de *S. Enteritidis* no ceco e nas excretas de frangos de corte alimentados com dietas contendo a BOE. Para isso, as aves com 2 dias de idade foram inoculadas com *S. Enteritis* MB089-R, tendo o crescimento bacteriano atingido o ápice no ceco e excretas dos frangos de corte com nove dias após a inoculação. Neste estágio, apenas as aves que consumiram as dietas com o maior nível da BOE (700 ppm), que foi o valor determinado na MIC, apresentaram uma redução significativa da quantidade de *Salmonella* tanto no ceco quanto nas excretas. As doses inferiores (70 e 140 ppm da BOE) que se apresentaram efetivas no controle da *Salmonella in vitro*, não desempenharam o mesmo resultado no teste *in vivo*. De fato, as condições no laboratório muitas vezes não refletem o metabolismo do animal e o comportamento do patógeno *in vivo*, servindo apenas como referência. A diminuição da bactéria nas excretas é também apenas um indicativo, uma vez que estão sujeitas ao ambiente externo e muitas vezes pode haver multiplicação bacteriana diferente do que estaria acontecendo dentro da ave, que é um ambiente mais controlado. Estes resultados nos orientam a supor que, na prática, é necessária uma maior quantidade de óleos essenciais na dieta para estar presente no conteúdo gastrintestinal das aves e, assim, agir no controle da *Salmonella*. Estudos têm demonstrado que os compostos fenólicos como timol, carvacrol e eugenol atuam de forma principal sobre a permeabilidade da membrana bacteriana, com o consequente extravasamento de material intracelular culminando na apoptose (Di PASQUA et al., 2006; DEVI et al., 2010). Deste modo, para este mecanismo de ação se comprovar, seria necessário o contato do óleo essencial com a *Samonella*, o que pode ocorrer se a molécula atingir o ceco das aves. Também, outra suposição seria na ação moduladora dos óleos essenciais com o aumento das bactérias benéficas, contribuindo para a redução das patogênicas, como a *Salmonella* (OUWEHAND et al., 2010). Isto posto, a hipótese de que as aves ingerindo a BOE microencapsulada através da dieta apresentassem uma redução do patógeno no ceco se viabilizou, demonstrando seu potencial de uso nas dietas de frangos de corte para o auxílio no controle da *Salmonella* na cadeia avícola

Baseado no interesse crescente em estudos de aditivos naturais como potenciais antioxidantes, já que a rejeição geral dos consumidores aos aditivos alimentares sintéticos vem aumentando nos últimos tempos, além da atividade antimicrobiana, a mesma blenda de óleos essenciais na forma microencapsulada e os mesmos níveis foram também avaliados por sua atividade antioxidante.

A condição de estar na forma microencapsulada não prejudicou o teor de fenólicos totais e a atividade antioxidante dos óleos essenciais estudados, sendo que este resultado foi confirmado quando a BOE microencapsulada foi incorporada diretamente na matriz cárnea para a fabricação de almôndegas. Ficou evidente o efeito antioxidante da BOE, possivelmente devido à presença comprovada do grupo fenólico (OH) que age doando o hidrogênio (BRENES; RORA, 2010) contendo o processo oxidativo. Nas almôndegas pré-cozidas de carne de peito de frango, a mistura de 70 ppm da BOE foi tão efetiva em conter a ação oxidativa causada pelo processamento térmico, quanto a inclusão de 150 ppm do antioxidante sintético BHT. Quando as almôndegas foram produzidas com carne de sobrecoxa, o antioxidante sintético BHT (150 ppm) não atuou de forma tão eficaz quanto o nível de 140 ppm de BOE na contenção do processo de oxidação, sugerindo uma melhor ação antioxidante da BOE. Com base nestes resultados, a BOE na forma microencapsulada pode atuar como um aditivo natural na elaboração de produtos cárneos. No entanto, infelizmente, não foi possível fazer a análise sensorial deste produto, sendo uma importante ferramenta de aceitação e validação dos níveis de BOE nas misturas cárneas.

A atuação dos óleos essenciais na incorporação da matriz cárnea é mais plausível de se explicar. Os compostos fenólicos têm ação no contato direto com a massa cárnea, favorecendo sua atuação no controle do processo de rancidez. Entretanto, a atividade destes mesmos compostos, quando ingeridos pelos frangos de corte, ainda necessita de um maior entendimento e comprovação científica. Os resultados obtidos no ensaio antioxidante com os frangos de corte certificaram que a suplementação da ração com níveis da BOE microencapsulada e Etoxiquim (antioxidante sintético) retardaram a oxidação lipídica, demonstrada como menor formação de malonaldeído (MDA) nos músculos das aves. Isso fornece evidências indiretas de que esses antioxidantes poderiam ser absorvidos e entrar no sistema circulatório após ingestão, atuando no músculo dos animais. A susceptibilidade da carne à oxidação lipídica depende da espécie animal, do tipo e localização anatômica dos músculos (RHEE et al., 1996; BRAGAGNOLO, 2001). Avaliando os resultados, a suplementação alimentar com os aditivos antioxidantes (BOE e

Ettoxiquim) atrasaram a oxidação lipídica de forma mais evidente na sobrecoxa, mas não no músculo do peito, após o armazenamento a 4 °C. Estudos indicam que o músculo da sobrecoxa é mais suscetível à oxidação em comparação ao músculo do peito ((BOTSOGLOU et al., 2002 a, 2003 b; BOLUKBASI et al., 2006). Considerando que o MDA é produzido como resultado da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados (PUFA) (ULU, 2004) é de se esperar diferenças de efeito dos mesmos compostos antioxidantes em tipos de músculos diferentes com teores variados de PUFA. Esta afirmação é apoiada pelos nossos resultados, em que a carne da sobrecoxa apresentou maiores teores de extrato etéreo e, assim, quantidade absoluta de PUFA em comparação a carne proveniente do peito das aves.

Da mesma maneira que ocorreu no ensaio antimicrobiano, se repetiu no ensaio antioxidante, em que os níveis inferiores de BOE (70 e 140 ppm) não foram suficientemente capazes de controlar a colonização por *Salmonella* no ceco das aves e a oxidação lipídica em almôndegas pré-cozidas, respectivamente. Em ambos os ensaios *in vivo* ficou evidente que as ações da BOE ocorreram apenas com a inclusão do maior nível na dieta (700 ppm de BOE). Por certo, o intervalo entre 140 e 700 ppm é muito extenso (cinco vezes maior), o que justifica uma melhor investigação neste intervalo de atuação do BOE, tanto na atividade anti-*Salmonella* como na atividade antioxidante. Assim, os resultados obtidos no presente trabalho fornecem um ponto de partida para a formulação de novas hipóteses, a fim de melhorar a compreensão dos vários mecanismos de ação pelos quais as complexas moléculas de óleos essenciais atuam.

Referências

- BOTSOGLOU, N. A. et al. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 62, n. 2, p. 259-265, 2002.
- BOTSOGLOU, N. A. et al. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation. **Food Research International**, v. 36, n. 3, p. 207-213, 2003.
- BOLUKBASI, S. C.; ERHAN, M. K.; OZKAN, A. Effect of dietary thyme oil and vitamin E on growth, lipid oxidation, meat fatty acid composition and serum lipoproteins of broilers. **South African Journal of Animal Science**, v. 36, n. 3, p. 189-196, 2006.

BRAGAGNOLO, N. **Aspectos comparativos entre carnes segundo a composição de ácidos graxos e teor de colesterol.** SEGUNDA CONFERENCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA. 2001.

Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais01cv2_bragagnolo_pt.pdf>.
Acesso em: 29 de outubro de 2012.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. *International journal of food microbiology*, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

DEVI, K.P., et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107–115, 2010.

DI PASQUA, Rosangela et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, 2006.

HENDRIKSEN, R. S., et al. 2011. Global monitoring of Salmonella serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis* 8:887–900. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2010.0787>.

KOLLANOOR JOHNY, A., et al. Prophylactic supplementation of caprylic acid in feed reduces *Salmonella enteritidis* colonization in commercial broiler chicks. **Journal of food protection**, v. 72, n. 4, p. 722-727, 2009.

LEE, K.-W.; EVERTS, H.; BEYNEN, A. C. Essential Oils in Broiler Nutrition. **International Journal of Poultry Science**, v. 3, n. 12, p. 738-752, 2004.

RHEE, K. S.; ANDERSON, L. M.; SAMS, A. R. Lipid oxidation potential of beef, chicken, and pork. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 1, p. 8-12, 1996.

ULU, Hasret. Evaluation of three 2-thiobarbituric acid methods for the measurement of lipid oxidation in various meats and meat products. **Meat Science**, v. 67, n. 4, p. 683-687, 2004.

OUWEHAND, A. C. et al. *In vitro* effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. **Veterinarni Medicina**, v. 55, n. 2, p. 71-78, 2010.

- CAPÍTULO 6 -

CONCLUSÃO GERAL

Através da caracterização química e das determinações das atividades anti-*Salmonella in vitro* dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* e *Ocimum gratissimum* foi possível determinar que a sua blenda, caracterizada pela proporção de 1 parte de timol+carvacrol e 3 partes de eugenol, foi capaz de controlar o crescimento de *S. enterica* serovar Enteritidis na concentração de 700 µg/mL. Quando a blenda de óleos essenciais (BOE) foi microencapsulada e adicionada nas dietas de frangos de corte, o nível de 700 ppm foi capaz de diminuir a colonização do patógeno no ceco e excreta das aves desafiadas com *S. Enteritidis*.

O processo de microencapsulação não prejudicou a quantidade de fenólicos totais e a capacidade antioxidante da BOE nos ensaios *in vitro*, resultado ratificado no ensaio *in situ*, com a incorporação da BOE na matriz de carne. O acréscimo de 70 e 140 ppm de BOE microencapsulada, diretamente na carne, ofereceu proteção contra o desenvolvimento dos níveis de rancidez produzidos durante o processamento térmico das almôndegas de carne de peito e sobrecoxa, respectivamente. Quando a BOE microencapsulada foi adicionado às dietas dos frangos de corte em seu maior nível de inclusão (700 ppm), este foi eficaz em minimizar e retardar a oxidação dos lipídios durante o armazenamento a 4 °C, em especial nas almôndegas pré-cozidas da carne de sobrecoxa.

Desse modo, os resultados obtidos mostram que foi possível o desenvolvimento de um produto natural à base de óleos essenciais das espécies aromáticas de *T. vulgaris* e *O. gratissimum* na forma microencapsulada, para ser adicionado nas dietas de frangos de corte com atuação tanto anti-*Salmonella*, como antioxidante. Ademais, graças as suas propriedades antioxidantes, o produto também se mostrou eficiente em conter o processo de oxidação quando incorporado na carne de frango, sendo uma opção natural para aplicação em formulações cárneas.

- CAPÍTULO 7 -

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDEL-WARETH, A. A. A. et al. Effects of thyme and oregano on growth performance of broilers from 4 to 42 days of age and on microbial counts in crop, small intestine and caecum of 42-day-old broilers. **Animal feed science and technology**, v. 178, n. 3, p. 198-202, 2012.
- ADAMS, R. P. Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. **Allured: Carol Stream, IL**, 2001.
- AGUIRRE, J.M.; TRAVAGLINI, D.A.; SILVEIRA, E.T.F. **Desidratação de ovos**. Boletim do Instituto de Tecnologia de Alimentos, 1979. p.261-287.
- AKINMOLADUN, Afolabi C. et al. Phytochemical constituent and antioxidant activity of extract from the leaves of *Ocimum gratissimum*. **Scientific Research and Essays**, v. 2, n. 5, p. 163-166, 2007.
- ALAHAKOONA, A. U., et al. Alternatives to nitrite in processed meat: Up to date. **Trends in Food Science & Technology**, v. 45, p. 37–49, 2015.
- ALALI, W. Q. et al. Effect of essential oil compound on shedding and colonization of *Salmonella enterica* serovar Heidelberg in broilers. **Poultry science**, v. 92, n. 3, p. 836-841, 2013.
- ALASNIER, C. et al. Hydrolytic and oxidative changes in the lipids of chicken breast and thigh muscles during refrigerated storage. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 1, p. 9-14, 2000.
- ALI, A. S. A.; HARRISON, A. P.; JENSEN, J. F. Effects of some ante-mortem stressors on peri-mortem and postmortem biochemical changes and tenderness in broiler breast muscle: A review. **World's Poultry Science Journal**, v. 55, p.403–414, 1999.
- ALIPOUR, Fahimeh et al. Effect of plant extracts derived from thyme on male broiler performance. **Poultry science**, v. 94, n. 11, p. 2630-2634, 2015.
- AL-KASSIE, GHALIB AM et al. Influence of two plant extracts derived from thyme and cinnamon on broiler performance. **Pakistan Veterinary Journal**, v. 29, n. 4, p. 169-173, 2009.
- ALLEN, C. D. et al. The relationship of broiler breast color to meat quality and shelf-life. **Poultry Science**, v. 77, n. 2, p. 361-366, 1998.

- ALVARENGA BOTREL, Diego et al. Evaluation of spray drying conditions on properties of microencapsulated oregano essential oil. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 47, n. 11, p. 2289-2296, 2012.
- AMERAH, A. M.; MATHIS, G.; HOFACRE, C. L. Effect of xylanase and a blend of essential oils on performance and Salmonella colonization of broiler chickens challenged with Salmonella Heidelberg. **Poultry science**, v. 91, n. 4, p. 943-947, 2012.
- ANDERSON, ES. Drug resistance in *Salmonella typhimurium* and its implications. **Br Med J**, v.3, p. 333-339, 1968. Disponível em: <doi: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.3.5614.333>>.
- ANDERSSON, Dan I.; HUGHES, Diarmaid. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 7, p. 465-478, 2014.
- ANVISA, 2017. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/anvisa/legis/decretos/50040_61.htm. Acesso em 10 de agosto de 2017.
- AOAC. (ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS). **Official methods of analysis**. 18.ed. Washington: AOAC, 2007. 3000p.
- ATTI-SANTOS, A. C. et al. Seasonal variation of essential oil yield and composition of *Thymus vulgaris* L.(Lamiaceae) from South Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 16, n. 4, p. 294-295, 2004.
- AUSTGULEN, Liv-Torill; SOLHEIM, Einar; SCHELIN, Ronald R. Metabolism in rats of p-cymene derivatives: carvacrol and thymol. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 61, n. 2, p. 98-102, 1987.
- AVALTRONI, F.; BOUQUERAND, P. E.; NORMAND, V. Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 3, p. 323-334, 2004.
- AVILA-RAMOS, F.; et al. Effects of dietary oregano essential oil and vitamin E on the lipid oxidation stability of cooked chicken breast meat. *Poultry Science*, v. 91, p. 505-511.

- AWAH, Francis M. et al. Antioxidant activity, nitric oxide scavenging activity and phenolic contents of *Ocimum gratissimum* leaf extract. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 23, p. 2479-2487, 2010.
- BAJPAI, Vivek K.; BAEK, Kwang-Hyun; KANG, Sun Chul. Control of Salmonella in foods by using essential oils: A review. **Food Research International**, v. 45, n. 2, p. 722-734, 2012.
- BAKKALI, F, et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BAKOWSKA-BARCZAK, Anna M.; KOŁODZIEJCZYK, Paul P. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 2, p. 1301-1309, 2011.
- BARROW, P. A.; SIMPSON, Joan M.; LOVELL, Margaret A. Intestinal colonisation in the chicken by food-poisoning salmonella serotypes; Microbial characteristics associated with faecal excretion. **Avian Pathology**, v. 17, n. 3, p. 571-588, 1988.
- BARTOV, I.; BORNSTEIN, S. Stability of abdominal fat and meat of broilers: Combined effect of dietary vitamin E and synthetic antioxidants. **Poultry Science**, v. 60, n. 8, p. 1840-1845, 1981.
- BASER, K. Husnu Can; BUCHBAUER, Gerhard (Ed.). **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC Press, 2015.
- BEN ARFA, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in applied microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149-154, 2006.
- BENTAYEB, Karim et al. The additive properties of Oxygen Radical Absorbance Capacity (ORAC) assay: The case of essential oils. **Food chemistry**, v. 148, p. 204-208, 2014.
- BERGQUIST, Dwight H. **Spray dryer**. U.S. Patent n. 4,358,341, 9 nov. 1982.
- BLIGH, E. Graham; DYER, W. Justin. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian journal of biochemistry and physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.

- BOLUKBASI, S. C.; ERHAN, M. K.; OZKAN, A. Effect of dietary thyme oil and vitamin E on growth, lipid oxidation, meat fatty acid composition and serum lipoproteins of broilers. **South African Journal of Animal Science**, v. 36, n. 3, p. 189-196, 2006.
- BOTSOGLOU, N. A. et al. Inhibition of lipid oxidation in long-term frozen stored chicken meat by dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate supplementation. **Food Research International**, v. 36, n. 3, p. 207-213, 2003 b.
- BOTSOGLOU, N. A. et al. The effect of dietary oregano essential oil on lipid oxidation in raw and cooked chicken during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 62, n. 2, p. 259-265, 2002 a.
- BOTSOGLOU, N. A. et al. The effects of dietary oregano essential oil and α -tocopheryl acetate on lipid oxidation in raw and cooked turkey during refrigerated storage. **Meat Science**, v. 65, n. 3, p. 1193-1200, 2003 a.
- BOTSOGLOU, N. A., et al.. Effect of dietary oregano essential oil on performance of chickens and on iron-induced lipid oxidation of breast, thigh and abdominal fat tissues. **British Poultry Science.**, v. 43, p. 223-230, 2002 b.
- BOU, R. et al. Dose and duration effect of α -tocopheryl acetate supplementation on chicken meat fatty acid composition, tocopherol content, and oxidative status. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.54, p.5020-5026, 2006.
- BOZIN, Biljana et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1822-1828, 2006.
- BRAGAGNOLO, N. **Aspectos comparativos entre carnes segundo a composição de ácidos graxos e teor de colesterol.** SEGUNDA CONFERENCIA INTERNACIONAL VIRTUAL SOBRE QUALIDADE DE CARNE SUÍNA. 2001. Disponível em: <http://www.cnpsa.embrapa.br/sgc/sgc_publicacoes/anais01cv2_bragagnolo_pt.pdf>. Acesso em: 29 de outubro de 2012.

BRAGAGNOLO, Neura; DANIELSEN, Bente; SKIBSTED, Leif H. Effect of rosemary on lipid oxidation in pressure-processed, minced chicken breast during refrigerated storage and subsequent heat treatment. **European Food Research and Technology**, v. 221, n. 5, p. 610-615, 2005.

BRASIL FOOD TRENDS 2020.2012. Disponível em
<<http://www.brasilfoodtrends.com.br/publicacao.html>>. Acesso em 15 de setembro de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Atribuição de Função de Aditivos e seus Limites Máximos de uso para a Categoria 8 - Carne e Produtos Cárneos – SVS/MS, 1998. Disponível em
<<http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:ahNJY4WNYZEJ:portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/Portaria%252Bn%2525C2%2525BA%252B1004%25252C%252Bde%252B11%252Bde%252Bdezembro%252Bde%252B1998.pdf/41e1bc8f-b276-4022-9afb-ff0bb3c12c0c+&cd=3&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br&client=firefox-b>>. Acesso em 09 de novembro de 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos – VE-DTA. 2014. Disponível em
<http://www.anrbrasil.org.br/new/pdfs/2014/3_PAINEL_1_ApresentacaoRejaneAlvesVigilanciaEpidemiologica-VE-DTA-Agosto_2014_PDF.pdf>. Acesso em: 13 de junho de 2015.

BUCKLE, J. Clinical Aromatherapy: Essential Oils in Practice, 2015, 375p. Third edition. Churchill Livingstone, 2015. Elsevier Inc. ISBN: 978-0-7020-5440-2

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 467-483, 2011.

BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BUSATTA, C. et al. Application of *Origanum majorana* L. essential oil as an antimicrobial agent in sausage. **Food microbiology**, v. 25, n. 1, p. 207-211, 2008.

- CALLIGARISA, S., et al. Shelf life assessment of food undergoing oxidation - A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. 2015. Disponível em: <doi:10.1080/10408398.2013.807222>. Acesso em 12 de novembro de 2015.
- CALO, Juliany Rivera et al. Salmonella Heidelberg Strain Responses to Essential Oil Components. **Journal of Food Research**, v. 4, n. 5, p. 73, 2015.
- CAO, G.; ALESSIO, H. M.; CUTLER, R. G. Oxygen-radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology Medicine**, v.14, p. 303-311, 1993.
- CAPASSO, Francesco. **Phytotherapy: a quick reference to herbal medicine**. Springer Science & Business Media, 2003.
- CARLET, J., et al. Ready for a world without antibiotics? The Pensières Antibiotic Resistance Call to Action. **Antimicrobial Resistance and Infection Control**, 1:11 2012. Disponível em: <<http://www.aricjournal.com/content/1/1/11>>. Acesso em 04 de outubro de 2015.
- CARNEIRO, Helena CF et al. Encapsulation efficiency and oxidative stability of flaxseed oil microencapsulated by spray drying using different combinations of wall materials. **Journal of Food Engineering**, v. 115, n. 4, p. 443-451, 2013.
- CAROCHO, Márcio; FERREIRA, Isabel CFR. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, p. 15-25, 2013.
- CARSON, Christine F.; HAMMER, Katherine A. Chemistry and bioactivity of essential oils. **Lipids and essential oils as antimicrobial agents**, p. 203-238, 2011.
- CELIK TAS, O. Yesil et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553-559, 2007.

- CERISUELO, A. et al. The impact of a specific blend of essential oil components and sodium butyrate in feed on growth performance and *Salmonella* counts in experimentally challenged broilers. **Poultry science**, v. 93, n. 3, p. 599-606, 2014.
- CERQUEIRA, Fernanda Menezes; DE MEDEIROS, Marisa Helena Gennari; AUGUSTO, Ohara. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441, 2007.
- CHANG, Xianmin; ALDERSON, Peter G.; WRIGHT, Charles J. Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1, p. 216-223, 2008.
- CHARLES, Denys J.; SIMON, James E. A new geraniol chemotype of *Ocimum gratissimum* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 4, n. 3, p. 231-234, 1992.
- CHAUHAN, Anil Kumar; KANG, Sun Chul. Thymol disrupts the membrane integrity of *Salmonella* ser. typhimurium *in vitro* and recovers infected macrophages from oxidative stress in an ex vivo model. **Research in microbiology**, v. 165, n. 7, p. 559-565, 2014.
- CHEN, C. H., A. M. PEARSON; J. I. GRAY. Effects of synthetic antioxidants (BHA, BHT and PG) on the mutagenicity of IQ-like compounds. **Food Chemistry**, v. 43, p.169–249, 1992.
- CHORIANOPOULOS N.; et al. Essential oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* species: chemical composition and antibacterial activities against foodborne pathogens. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 52, p. 8261-8267, 2004.
- CLSI, 2012. Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico: Norma Aprovada – Sexta Edição. Download in 14 de fevereiro de 2014.
- CONSENTINO, S. et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in applied microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130-135, 1999.
- CORRIER, D. E., et al. Presence of *Salmonella* in the crop and ceca of broiler chickens before and after preslaughter feed withdrawal. **Poultry Science**, v.78, p.45-49, 1999.

- CORTINAS, L.; et al. Influence of the Dietary Poly-unsaturation Level on Chicken Meat Quality: Lipid Oxidation. **Poultry Science**, v.84, p.48-55, 2005.
- CROSS, D. E. et al. The effect of herbs and their associated essential oils on performance, dietary digestibility and gut microflora in chickens from 7 to 28 days of age. **British poultry science**, v. 48, n. 4, p. 496-506, 2007.
- CROSS, D. E. et al. The performance of chickens fed diets with and without thyme oil and enzymes. **British Poultry Science**, v. 44, n. S1, p. 18-19, 2003.
- DAL BOSCO, A. et al. Effect of dietary supplementation of Spirulina (*Arthrospira platensis*) and Thyme (*Thymus vulgaris*) on rabbit meat appearance, oxidative stability and fatty acid profile during retail display. **Meat science**, v. 96, n. 1, p. 114-119, 2014.
- DASHTI, Neda Ganjali et al. Antioxidant Effect of Thyme Essential Oil on Oxidative Stability of Chicken Nuggets. **International Journal of Food Engineering**, v. 1, n. 2, 2015.
- DÁVALOS, A.; GÓMEZ-CORDOVÉS, C.; BARTOLOMÉ, B. Extending applicability of the oxygen radical absorbance capacity (ORAC-fluorescein) assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 1, p. 48-54, 2004.
- DAWIDOWICZ, Andrzej L.; OLSZOWY, Małgorzata. Does antioxidant properties of the main component of essential oil reflect its antioxidant properties? The comparison of antioxidant properties of essential oils and their main components. **Natural product research**, v. 28, n. 22, p. 1952-1963, 2014.
- DE AZEREDO, Henriette Monteiro Cordeiro. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, p. 89-97, 2005.
- DE BARROS FERNANDES, Regiane Victória; BORGES, Soraia Vilela; BOTREL, Diego Alvarenga. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. **Carbohydrate polymers**, v. 101, p. 524-532, 2014.

- DE VOS, Paul et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010.
- DEANS, S.G.; et al. Promotional effects of plant volatile oils on the polyunsaturated fatty acid status during aging. **Journal Essential Oil Research**, v. 16, p.71–74, 1993.
- DELAZARI, I. Abate e processamento de carne de aves para garantia da qualidade. In: **CONFERÊNCIA APINCO**. 2001. p. 191-203.
- DESMIDT, Maria; DUCATELLE, Richard; HAESEBROUCK, Freddy. Research notes: Immunohistochemical observations in the ceca of chickens infected with *Salmonella enteritidis* phage type four. **Poultry science**, v. 77, n. 1, p. 73-74, 1998 b.
- DESMIDT, Miek; DUCATELLE, Richard; HAESEBROUCK, Freddy. Serological and bacteriological observations on experimental infection with *Salmonella hadar* in chickens. **Veterinary microbiology**, v. 60, n. 2, p. 259-269, 1998 a.
- DEVI, K.P., et al. Eugenol (an essential oil of clove) acts as an antibacterial agent against *Salmonella typhi* by disrupting the cellular membrane. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, p. 107–115, 2010.
- DI PASQUA, Rosangela et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addiction of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, 2006.
- DORMAN, H. J. D.; SURAI, P.; DEANS, S. G. *In vitro* antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents. **Journal Essential Oil Research**, v. 12, p.241–248, 2000.
- DORMAN, H.J.D., DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, p.308– 316, 2000.
- DUARTE, Dalila Angélica Moliterno et al. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 40, n. 3, p. 569-573, 2009.

- DUARTE, Marta Cristina Teixeira et al. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 197-201, 2007.
- DUDONNÉ, S.; et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 1768–1774, 2009.
- EFSA, 2011. Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS): Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxyanisole–BHA (E 320) as a food additive. EFSA J. 9(10), 2392. doi: 10.2903/j.efsa.2011.2392. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2392.pdf>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2017.
- EFSA, 2012. Panel on food additives and nutrient sources added to food (ANS); Scientific opinion on the reevaluation of butylated hydroxytoluene BHT (E 321) as a food additive. EFSA J. 10(3), 2588. doi: 10.2903/j.efsa.2012.2588. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/doc/2588.pdf>>. Acesso em 10 de fevereiro de 2017.
- EFSA. European Food Safety Authority. EFSA Journal, 12(2), 3547, 2014.
- EL-ALIM, Souzan Saad Latif Abd et al. Culinary herbs inhibit lipid oxidation in raw and cooked minced meat patties during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, n. 2, p. 277-285, 1999.
- ESTÉVEZ, Mario; CAVA, Ramón. Effectiveness of rosemary essential oil as an inhibitor of lipid and protein oxidation: Contradictory effects in different types of frankfurters. **Meat Science**, v. 72, n. 2, p. 348-355, 2006.
- FALOWO, Andrew B.; FAYEMI, Peter O.; MUCHENJE, Voster. Natural antioxidants against lipid–protein oxidative deterioration in meat and meat products: A review. **Food Research International**, v. 64, p. 171-181, 2014.
- FANG, Zhongxiang; BHANDARI, Bhesh. Encapsulation of polyphenols—a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510-523, 2010.

FAO. <http://www.faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/go/download/O/OA/E>. Acesso em: 20/11/2013.

FARAG, R.S., et al. Antimicrobial activity of some Egyptian spice essential oils. **Journal of Food Protection**, v 52 (9), p. 665– 667, 1989.

FASSEAS, M. K. et al. Antioxidant activity in meat treated with oregano and sage essential oils. **Food Chemistry**, v. 106, n. 3, p. 1188-1194, 2008.

FDA. Food and Drug Administration. FDA Takes Significant Steps to Address Antimicrobial Resistance. Estados Unidos, 2013. Disponível em: <<http://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm378166.htm>>. Acesso em: 20 de outubro de 2015.

FELLENBERG, M. A.; SPEISKY, H. Antioxidants: their effects on broiler oxidative stress and its meat oxidative stability. **World's Poultry Science Journal**, v. 62, n. 01, p. 53-70, 2006.

FISCHER, I. U.; VON UNRUH, G. E.; DENGLER, H. J. The metabolism of eugenol in man. **Xenobiotica**, v. 20, n. 2, p. 209-222, 1990.

FISCHER, Karl. A new method for the analytical determination of the water content of liquids and solids. **Angew. Chem**, v. 48, n. 394, p. 24, 1935.

FLETCHER, D. L. Poultry meat quality. **World's Poultry Science Journal**, v. 58, n. 02, p. 131-145, 2002.

FLOROU-PANERI, P. et al. Oregano herb versus oregano essential oil as feed supplements to increase the oxidative stability of turkey meat. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 11, p. 866-871, 2005.

FRANZ, Chlodwig; NOVAK, Johannes. Sources of essential oils. **Handbook of essential oils: science, technology, and applications**. CRC, New York, p. 39-81, 2009.

- FRATIANNI, Florinda et al. Preservation of chicken breast meat treated with thyme and balm essential oils. **Journal of food science**, v. 75, n. 8, p. M528-M535, 2010.
- FREIRE, Cristiana M. Murbach; MARQUES, Márcia Ortiz M.; COSTA, Mirtes. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, n. 1, p. 161-166, 2006.
- FU, YuJie et al. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy Research**, v. 21, n. 10, p. 989-994, 2007.
- GALBIATI, V. et al. Further development of the NCTC 2544 IL-18 assay to identify *in vitro* contact allergens. **Toxicology in Vitro**, v. 25, n. 3, p. 724-732, 2011.
- GANG, David R. et al. An investigation of the storage and biosynthesis of phenylpropenes in sweet basil. **Plant Physiology**, v. 125, n. 2, p. 539-555, 2001.
- GHARSALLAOUI, Adem et al. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.
- GOVARIS, A. et al. Dietary supplementation of oregano essential oil and-tocopheryl acetate on microbial growth and lipid oxidation of turkey breast fillets during storage. **International Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 12, p. 969-975, 2005.
- GRAY, J.I.; GOMAA, E.A; BRUCKLEY, D.J. Oxidative quality and shelf life of meats. **Meat Science**, v.43, p.111-123, 1996.
- HASELMEYER, Alexander; ZENTEK, Jürgen; CHIZZOLA, Remigius. Effects of thyme as a feed additive in broiler chickens on thymol in gut contents, blood plasma, liver and muscle. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 95, n. 3, p. 504-508, 2015.
- HASHEMI, S. R.; DAVOODI, H. Herbal plants and their derivatives as growth and health promoters in animal nutrition. **Veterinary Research Community**, v.35, p.169-180, 2011.

- HASHEMIPOUR, Hamideh et al. Effect of thymol and carvacrol feed supplementation on performance, antioxidant enzyme activities, fatty acid composition, digestive enzyme activities, and immune response in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 92, n. 8, p. 2059-2069, 2013.
- HAUTRIVE, Tiffany Prokopp et al. AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL, COLESTEROL E PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DE CORTES CÁRNEOS COMERCIAIS DE AVESTRUZ, SUÍNO, BOVINO E FRANGO. **Brazilian Journal of Food & Nutrition/Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 2, 2012.
- HELANDER, Ilkka M. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on Gram-negative bacteria. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.
- HENDRIKSEN, R. S., et al. 2011. Global monitoring of Salmonella serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis* 8:887–900. <http://dx.doi.org/10.1089/fpd.2010.0787>.
- HERNANDEZ, F. et al. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. **Poultry science**, v. 83, n. 2, p. 169-174, 2004.
- HOFFMAN-PENNESI, D.; WU, C. The effect of thymol and thyme oil feed supplementation on growth performance, serum antioxidant levels, and cecal Salmonella population in broilers. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 19(4), p. 432-443, 2010.
- HUDAIB, Mohammad et al. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 29, n. 4, p. 691-700, 2002.
- HUDAIB, Mohammad et al. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 29, n. 4, p. 691-700, 2002.
- HUMPHREY, T., JORGENSEN, F. Pathogens on meat and infection in animals- Establishing a relationship using *campylobacter* and *salmonella* as example. **Meat Science**, v. 74, p.89-97, 2006.

- HUSSAIN, Abdullah Ijaz et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food chemistry**, v. 108, n. 3, p. 986-995, 2008.
- HYLDGAARD M., MYGIND T., MEYER R. L.. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Front Microbiology**, v. 3, n. 12, 2012.
- IAL- Instituto Adolfo Lutz. (2008). Normas analíticas do Instituto Adolfo Lutz: métodos químicos e físicos para análises de alimentos. (4ª ed., 1ª ed. digital). São Paulo.
- IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, 2012. Disponível em: <<http://www.iarc.fr/search.php?cx=009987501641899931167%3Aajwf5bx4tx78&cof=FORID%3A9&ie=UTF-8&ie=ISO-8859-1&oe=ISO-8859-1&sa=&q=BHT#gsc.tab=0&gsc.q=BHT&gsc.page=1>>. Acesso em 25 de outubro de 2016.
- JAFARI, Seid Mahdi et al. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816-835, 2008.
- JANBAZ, K. H.; SAEED, S. A.; GILANI, A. H. Hepatoprotective effect of thymol on chemical-induced hepatotoxicity in rodents. **Pak J Biol Sci**, v. 6, n. 5, p. 448-451, 2003.
- JAYASENA, Dinesh D.; JO, Cheorun. Potential application of essential oils as natural antioxidants in meat and meat products: a review. **Food Reviews International**, v. 30, n. 1, p. 71-90, 2014.
- JENSEN, C.; et al. Influence of the oxidative quality of dietary oil on broiler meat storage stability. **Meat Science**, v.47, p. 211-222, 1997.
- JERKOVIĆ, Igor; MASTELIĆ, Josip; MILOŠ, Mladen. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. **International journal of food science & technology**, v. 36, n. 6, p. 649-654, 2001.
- KÄHKÖNEN, Marja P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

- KAHL, R.; KAPPUS, H. Toxicology of the synthetic antioxidants BHA and BHT in comparison with the natural antioxidant vitamin E. **Zeitschrift für Lebensmittel-untersuchung und-forschung**, v. 196, n. 4, p. 329-338, 1993.
- KATSUBE, T.; et al.. Screening for antioxidant activity in edible plant products: comparison of low-density lipoprotein oxidation assay, DPPH radical scavenging assay and Folin-Ciocalteu assay. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 2391-2396, 2004.
- KHATTAK, F. et al. Effects of natural blend of essential oil on growth performance, blood biochemistry, cecal morphology, and carcass quality of broiler chickens. **Poultry science**, v. 93, n. 1, p. 132-137, 2014.
- KOHLERT, C. et al. Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. **Planta medica**, v. 66, n. 06, p. 495-505, 2000.
- KOLLANOOR JOHNY, A., et al. Antibacterial effect of trans-cinnamaldehyde, eugenol, carvacrol and thymol on *Salmonella* Enteritidis and *Campylobacter jejuni* in chicken cecal contents *in vitro*. **Journal Applied Poultry Research**, v.19, p. 237–244, 2010 a.
- KOLLANOOR JOHNY, A., T. A. HOAGLAND; K. VENKITANARAYANAN. Effect of subinhibitory concentrations of plant-derived molecules in increasing the sensitivity of multi-drug resistant *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 to antibiotics. **Foodborne Pathology. Disease**, v.7, p.1165–1170, 2010 b.
- KORELESKI, J.; SWIATKIEWICZ, S. Dietary supplementation with plant extracts, xanthophylls and synthetic antioxidants: Effect on fatty acid profile and oxidative stability of frozen stored chicken breast meat. **Journal of Animal Feed Science**, v. 16, p. 463–471, 2007.
- KRANEN, R. W. et al. Hemoglobin and myoglobin content in muscles of broiler chickens. **Poultry science**, v. 78, n. 3, p. 467-476, 1999.
- KRISHNAIAH, Duduku; SARBATLY, Rosalam; NITHYANANDAM, Rajesh. Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. **Chemical engineering research and design**, v. 90, n. 5, p. 622-632, 2012.

- KRISHNAN, Savitha; BHOSALE, Rajesh; SINGHAL, Rekha S. Microencapsulation of cardamom oleoresin: Evaluation of blends of gum arabic, maltodextrin and a modified starch as wall materials. **Carbohydrate polymers**, v. 61, n. 1, p. 95-102, 2005.
- LADIKOS, D.; LOUGOVOIS, V. Lipid oxidation in muscle foods: A review. **Food chemistry**, v. 35, n. 4, p. 295-314, 1990.
- LAHLOU, Mouhssen; BERRADA, Rached. Composition and niticidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L. acclimatized in Morocco. **Flavour and fragrance journal**, v. 18, n. 2, p. 124-127, 2003.
- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of applied microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.
- LANARI, M. C. et al. Effect of dietary tocopherols and tocotrienols on the antioxidant status and lipid stability of chicken. **Meat science**, v. 68, n. 2, p. 155-162, 2004.
- LANGER, Roselane Oliveira de Souza et al. Broiler transportation conditions in a Brazilian commercial line and the occurrence of breast PSE (Pale, Soft, Exudative) meat and DFD-like (Dark, Firm, Dry) meat. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 53, n. 5, p. 1161-1167, 2010.
- LANGEVELD, Wendy T.; VELDHUIZEN, Edwin JA; BURT, Sara A. Synergy between essential oil components and antibiotics: a review. **Critical reviews in microbiology**, v. 40, n. 1, p. 76-94, 2014.
- LEE, E. N. et al. *In vitro* studies of chicken egg yolk antibody (IgY) against *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium*. **Poultry Science**, v. 81, n. 5, p. 632-641, 2002.
- LEE, K. W. et al. Cinnamaldehyde, but not thymol, counteracts the carboxymethyl cellulose-induced growth depression in female broiler chickens. **Int. J. Poult. Sci**, v. 3, n. 9, p. 608-612, 2004.
- LEE, K.-W. et al. Effects of dietary essential oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **British poultry science**, v. 44, n. 3, p. 450-457, 2003.

- LEE, S. K.; MEI, L.; DECKER, E. A. Influence of sodium chloride on antioxidant enzyme activity and lipid oxidation in frozen ground pork. **Meat Science**, v. 46, n. 4, p. 349-355, 1997.
- LEE, S.J.; et al. Identification of volatile components in basil (*Ocimum basilicum* L.) and thyme leaves (*Thymus vulgaris* L.) and their antioxidant properties. **Food Chemistry**, v. 91, p. 131-137, 2005.
- LESIÓW, Tomasz; KIJOWSKI, Jacek. Impact of PSE and DFD meat on poultry processing-a review. **Polish journal of food and nutrition sciences**, v. 12, n.2, p. 3-8, 2003.
- LEWIS, K. Platforms for antibiotic discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 12, p.371-387, 2013.
Disponível em: <doi:10.1038/nrd3975>.
- LIMA, C. B., et al. Capacidade antioxidante de óleos de plantas do cerrado suplementados na dieta de frangos de corte em bolas de carne de coxa e sobrecoxa. IN: Conferência APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2013, Campinas/SP. Anais... Campinas/SP. FACTA, 2013.
- LIN, C.F.; et al. Effects of oxidized dietary oil and antioxidant supplementation on broiler growth and meat stability. **British Poultry Science**, v. 30, p. 855-864, 1989.
- LUNA, A.; et al. Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. **Poultry Science**, v.89, p.366-370, 2010.
- MANTEN, A. The non-medical use of antibiotics and the risk of causing microbial drug-resistance. **Bulletin of the World Health Organization**, 1963. Disponível em:< ncbi.nlm.nih.gov>.
- MARASCHIELLO, C.; SÁRRAGA, C.; GARCIA REGUEIRO, J. A. Glutathione peroxidase activity, TBARS, and α -tocopherol in meat from chickens fed different diets. **Journal of Agricultural and food Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 867-872, 1999.
- MARIUTTI, Lilian Regina Barros; BRAGAGNOLO, Neura. A oxidação lipídica em carne de frango e o impacto da adição de sálvia (*Salvia officinalis*, L.) e de alho (*Allium sativum*, L.) como antioxidantes naturais. **Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)**, v. 68, n. 1, p. 1-11, 2009.

- MATHER et al. Distinguishable epidemics of multidrug-resistant *Salmonella Typhimurium* DT104 in different hosts. **Science**, v. 341, p.1514, 2013. Disponível em: <doi:10.1126/science.1240578>.
- MATHEW, Sindhu; ABRAHAM, T. Emilia. Studies on the antioxidant activities of cinnamon (*Cinnamomum verum*) bark extracts, through various *in vitro* models. **Food Chemistry**, v. 94, n. 4, p. 520-528, 2006.
- MATHIAS, Simone Pereira et al. Alterações oxidativas (cor e lipídios) em presunto de peru tratado por Alta Pressão Hidrostática (APH). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 852-857, 2010.
- MICHIELS, Joris et al. *In vitro* degradation and *in vivo* passage kinetics of carvacrol, thymol, eugenol and trans-cinnamaldehyde along the gastrointestinal tract of piglets. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, n. 13, p. 2371-2381, 2008.
- MILADINOVIĆ, Dragoljub L. et al. Investigation of the chemical composition–antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 403, n. 4, p. 1007-1018, 2012.
- MIN, B; AHN, D. U. Mechanism of Lipid Peroxidation in meat and meat products -A Review. **Food Science Biotechnology**, v. 14, p. 152-163, 2005.
- MITSUMOTO, M., et al. Addition of tea catechins and vitamin C on sensory evaluation, colour and lipid stability during chilled storage in cooked or raw beef and chicken patties. **Meat Science**, v. 69, n.4, p. 773-779, 2005.
- MONAHAN, FRANK J. Oxidation of lipids in muscle foods: fundamental and applied concerns. **Antioxidants in muscle foods. Nutritional strategies to improve quality**, p. 3-23, 2000.
- MORRISSEY, P. A.; et al. Lipid stability in meat and meat products. **Meat Science**, v. 49, n.1, p.s73-s86, 1998.
- NAGABABU, E.; LAKSHMAIAH, N. Inhibition of microsomal lipid peroxidation and monooxygenase activities by eugenol. **Free radical research**, v. 20, n. 4, p. 253-266, 1994.

- NAGABABU, E.; SESIKERAN, B.; LAKSHMAIAH, N. The protective effects of eugenol on carbon tetrachloride induced hepatotoxicity in rats. **Free radical research**, v. 23, n. 6, p. 617-627, 1995.
- NAGABABU, Enika et al. Assessment of antioxidant activity of eugenol *in vitro* and *in vivo*. **Free Radicals and Antioxidant Protocols**, p. 165-180, 2010.
- NAIDU, K. A. Eugenol—an inhibitor of lipoxygenase-dependent lipid peroxidation. **Prostaglandins, leukotrienes and essential fatty acids**, v. 53, n. 5, p. 381-383, 1995.
- NAJAFI, P.; TORKI, M. Performance, blood metabolites and immunocompetence of broiler chicks fed diets included essential oils of medicinal herbs. **Journal of Animal and Veterinary Advances**, v. 9, n. 7, p. 1164-1168, 2010.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL (NRC). Nutrient Requirements of Poultry. Washington, D.C. 1994. 155p.
- NGUYEN, Dac Vinh, et al. Antioxidant effect of thyme in rape-seed oil. **Section Cellular and Molecular Biology**, 2000. Disponível em: < <http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=SK2000000433>>
- NUNES, Graciele Lorenzoni et al. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60-68, 2015.
- NUNES, Graciele Lorenzoni et al. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60-68, 2015.
- OCAK, N. et al. Performance of broilers fed diets supplemented with dry peppermint (*Mentha piperita* L.) or thyme (*Thymus vulgaris* L.) leaves as growth promoter source. **Czech Journal of Animal Science**, v. 53, n. 4, p. 169, 2008.
- OGATA, Masahiro; HOSHI, Midori; URANO, Shiro. Antioxidant activity of eugenol and related monomeric and dimeric compounds. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 48, n. 10, p. 1467-1469, 2000.

- OLASUPO, N. A. et al. Activity of natural antimicrobial compounds against *Escherichia coli* and *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **Letters in Applied Microbiology**, v. 37, n. 6, p. 448-451, 2003.
- OLIVEIRA, S.D., et al. Antimicrobial resistance in *Salmonella enteritidis* strains isolated from broiler carcasses, food, human and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, p. 297–305, 2005.
- OLSEN, Elisabeth et al. Analysis of early lipid oxidation in smoked, comminuted pork or poultry sausages with spices. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 19, p. 7448-7457, 2005 b.
- OSAWA, Cibele Cristina; DE FELÍCIO, Pedro Eduardo; GONÇALVES, Lireny Ap Guaraldo. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, v. 28, n. 4, p. 655, 2005.
- OUWEHAND, A. C. et al. *In vitro* effects of essential oils on potential pathogens and beneficial members of the normal microbiota. **Veterinarni Medicina**, v. 55, n. 2, p. 71-78, 2010.
- PANDEY, Abhay Kumar; SINGH, Pooja; TRIPATHI, Nijendra Nath. Chemistry and bioactivities of essential oils of some *Ocimum* species: an overview. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 4, n. 9, p. 682-694, 2014.
- PANG, Sook Fun; YUSOFF, Mashitah M.; GIMBUN, Jolius. Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 159-165, 2014.
- PEI, Rui-song et al. Evaluation of combined antibacterial effects of eugenol, cinnamaldehyde, thymol, and carvacrol against *E. coli* with an improved method. **Journal of food science**, v. 74, n. 7, 2009.
- PEÑALVER P.; et al. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the *Enterobacteriaceae* family. **APMIS**, v. 113, p. 1-6, 2005.

PENZ JUNIOR, A.M.; KOLLER, F. L. **A resposta brasileira as exigências no uso de antimicrobianos.**

In.: XIII Congresso Brasileiro de Veterinários Especialistas em Suínos – ABRAVES . p. 232. Anais... Florianópolis, 2007.

PEREIRA DA ROCHA, Ronicely et al. Influência do processo de secagem sobre os principais componentes químicos do óleo essencial de tomilho. **Revista Ceres**, v. 59, n. 5, 2012.

PEREIRA, Cíntia Alessandra Matiucci; MAIA, June Ferreira. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2007.

POPE, M. J.; CHERRY, T. E. An evaluation of the presence of pathogens on broilers raised on poultry litter treatment-treated litter. **Poultry Science**, v. 79, n. 9, p. 1351-1355, 2000.

POULOSE, A. J.; CROTEAU, Rodney. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 187, n. 2, p. 307-314, 1978.

PRABHU, K. S.; et al. *Ocimum gratissimum*: A review of its chemical, pharmacological and ethnomedicinal properties. **The Open Complementary Medicine Journal**, v. 1, p. 1-15, 2009.

QIAO, M. et al. The effect of broiler breast meat color on pH, moisture, water-holding capacity, and emulsification capacity. **Poultry Science**, v. 80, n. 5, p. 676-680, 2001.

RACANICCI, Aline MC et al. Antioxidant effect of dittany (*Origanum dictamnus*) in pre-cooked chicken meat balls during chill-storage in comparison to rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **European Food Research and Technology**, v. 218, n. 6, p. 521-524, 2004.

RACANICCI, Aline MC et al. Mate (*Ilex paraguariensis*) as dietary additive for broilers: performance and oxidative stability of meat. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 4, p. 655-661, 2011.

- RACANICCI, Aline MC; DANIELSEN, Bente; SKIBSTED, Leif H. Mate (*Ilex paraguariensis*) as a source of water extractable antioxidant for use in chicken meat. **European Food Research and Technology**, v. 227, n. 1, p. 255-260, 2008.
- RADHA KRISHNAN, K, et al. Antimicrobial and antioxidant effects of spice extracts on the shelf life extension of raw chicken meat. **International Journal of Food Microbiology**, v.171, p.32-40, 2014.
- RAHMAN, M. A. et al. Bacterio-pathological studies on salmonellosis, colibacillosis and pasteurellosis in natural and experimental infections in chickens. **Bangladesh Journal of Veterinary Medicine**, v. 2, n. 1, p. 1-8, 2004.
- REMUS, A. et al. A meta-analysis of the feed intake and growth performance of broiler chickens challenged by bacteria. **Poultry science**, v. 93, n. 5, p. 1149-1158, 2014.
- RENERRE, Michel et al. Influence of dietary fat and vitamin E on antioxidant status of muscles of turkey. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 237-244, 1999.
- REPETTO, Marisa; SEMPRINE, Jimena; BOVERIS, Alberto. Lipid peroxidation: chemical mechanism, biological implications and analytical determination. In: **Lipid peroxidation**. InTech, 2012.
- RHAYOUR K., et al. The mechanism of bactericidal action of oregano and clove essential oils and of their phenolic major components on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis*. **Journal Essential Oil Research.**, v. 15, p. 356–362, 2003.
- RHEE, K. S. et al. Fatty acid profiles of the total lipids and lipid oxidation in pork muscles as affected by canola oil in the animal diet and muscle location. **Meat Science**, v. 23, n. 3, p. 201-210, 1988.
- RHEE, K. S.; ANDERSON, L. M.; SAMS, A. R. Lipid oxidation potential of beef, chicken, and pork. **Journal of Food Science**, v. 61, n. 1, p. 8-12, 1996.
- RICE-EVANS, Catherine A.; MILLER, Nicholas J.; PAGANGA, George. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **Free radical biology and medicine**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

- RIMINI, Simone; PETRACCI, Massimiliano; SMITH, Douglas P. The use of thyme and orange essential oils blend to improve quality traits of marinated chicken meat. **Poultry science**, p. PS3601, 2014.
- ROBERT, Paz et al. Encapsulation of polyphenols and anthocyanins from pomegranate (*Punica granatum*) by spray drying. **International journal of food science & technology**, v. 45, n. 7, p. 1386-1394, 2010.
- ROBEY, W.; SHERMER, W. The damaging effects of oxidation. *Feed Mix*, v.2, n.5, p.22-26, 1994.
- ROBY, Mohamed Hussein Hamdy et al. Evaluation of antioxidant activity, total phenols and phenolic compounds in thyme (*Thymus vulgaris* L.), sage (*Salvia officinalis* L.), and marjoram (*Origanum majorana* L.) extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 43, p. 827-831, 2013.
- RODRIGUES, R.A.F. (2004). Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por spray drying, contendo extrato de café crioconcentrado. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- ROMANE, Abderrahmane; HARRAK, Rajae; BAHRI, Fouad. Use thyme essential oils for the prevention of salmonellosis. In: **Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathogen**. InTech, 2012.
- RYMER, C.; GIVENS, D. I. N-3 fatty acid enrichment of edible tissue of poultry: A review. **Lipids**, v. 40, p. 121-130, 2005.
- SAADAT SHAD, H. et al. Effects of Thymol and Carvacrol on Productive Performance, Antioxidant Enzyme Activity and Certain Blood Metabolites in Heat Stressed Broilers. **Iranian Journal of Applied Animal Science**, v. 6, n. 1, p. 195-202, 2016.
- SACCHETTI, Gianni et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.
- SAHA, A. K. et al. Salmonellosis in layer chickens: pathological features and isolation of bacteria from ovaries and inner content of laid eggs. **Journal of the Bangladesh Agricultural University**, v. 10, n. 1, p. 61-67, 2012.

- SAMPAIO, G. R. et al. Effect of natural antioxidant combinations on lipid oxidation in cooked chicken meat during refrigerated storage. **Food Chemistry**, v. 135, n. 3, p. 1383-1390, 2012.
- SANTOS, A. S., et al. Descrição de Sistema e de Métodos de Extração de Óleos Essenciais e Determinação de Umidade de Biomassa em Laboratório. 2004. Comunicado Técnico 99. Disponível em: <<http://www.infoteca.cnptia.embrapa.br/bitstream/doc/402448/1/com.tec.99.pdf>>.
- SANTURIO, J. M., et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.37, n.3, p.803-808, 2007.
- SARTORATO A., et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p.273-280, 2004.
- SCOTT, M.L.; et al. Nutrition of the chicken. 3ª edição. Ithaca: M. L. SCOTT & Associates, 1982, 562p.
- SELANI, M. M. et al. Wine industry residues extracts as natural antioxidants in raw and cooked chicken meat during frozen storage. **Meat science**, v. 88, n. 3, p. 397-403, 2011.
- SEOW, Yi Xin et al. Plant essential oils as active antimicrobial agents. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 5, p. 625-644, 2014.
- SERVAT, L. Atividade antinociceptiva e anticâncer *in vitro* de microencapsulados produzidos com extrato bruto e vouacapanos obtidos das sementes de *Pterodon pubescens* Benth. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Odontologia de Piracicaba, UNICAMP, Piracicaba, SP, 2010, 119 pp.
- SEVANIAN, Alex; HOCHSTEIN, Paul. Mechanisms and consequences of lipid peroxidation in biological systems. **Annual review of nutrition**, v. 5, n. 1, p. 365-390, 1985.
- SHAN, Bin et al. Antioxidant capacity of 26 spice extracts and characterization of their phenolic constituents. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 53, n. 20, p. 7749-7759, 2005.

- SHEEHY, P. J. A.; MORRISSEY, P. A.; FLYNN, A. Influence of heated vegetable oils and α -tocopheryl acetate supplementation on α -tocopherol, fatty acids and lipid peroxidation in chicken muscle. **British poultry science**, v. 34, n. 2, p. 367-381, 1993.
- SI, W. et al. *In vitro* assessment of antimicrobial activity of carvacrol, thymol and cinnamaldehyde towards Salmonella serotype Typhimurium DT104: effects of pig diets and emulsification in hydrocolloids. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 6, p. 1282-1291, 2006.
- SIMON, James E. et al. Basil: a source of essential oils. **Advances in new crops**, p. 484-489, 1999.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMMELA-RANVENSON, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteau reagent. **Methods of Enzymology**, v. 299, p. 152-178, 1999.
- SIU, G. M.; DRAPER, H. H. A survey of the malonaldehyde content of retail meats and fish. **Journal of Food Science**, v. 43, n. 4, p. 1147-1149, 1978.
- SMET, K.; et al. Lipid and Protein oxidation of broiler meat as influenced by dietary natural antioxidant supplementation. **Poultry Science**, v. 87, p. 1682-1688, 2008.
- SMITH-PALMER, A.; STEWART, J.; FYFE, Lorna. The potential application of plant essential oils as natural food preservatives in soft cheese. **Food microbiology**, v. 18, n. 4, p. 463-470, 2001.
- SOLADOYE, O. P. et al. Protein oxidation in processed meat: Mechanisms and potential implications on human health. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 14, n. 2, p. 106-122, 2015.
- SØRENSEN, G.; JØRGENSEN, S. S. A critical examination of some experimental variables in the 2-thiobarbituric acid (TBA) test for lipid oxidation in meat products. *Zeitschrift für Lebensmitteluntersuchung und Forschung A*, v. 202, p. 205-210, 1996.
- SOUSA, CM de M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

- SWANSON, Katherine MJ et al. Oil-and Fat-Based Foods. In: **Microorganisms in Foods 8**. Springer US, 2011. p. 247-261.
- TANG, Shuze et al. Antioxidative effect of added tea catechins on susceptibility of cooked red meat, poultry and fish patties to lipid oxidation. **Food Research International**, v. 34, n. 8, p. 651-657, 2001.
- THANISSERY, R.; KATHARIOU S.; SMITH D. P. Rosemary oil, clove oil, and a mix of thyme-orange essential oils inhibit Salmonella and Campylobacter *in vitro*. **Journal Applied Poultry Research**, v. 23, p. 221–227, 2014.
- TIIHONEN, Kirsti et al. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. **British poultry science**, v. 51, n. 3, p. 381-392, 2010.
- TIIHONEN, Kirsti et al. The effect of feeding essential oils on broiler performance and gut microbiota. **British poultry science**, v. 51, n. 3, p. 381-392, 2010.
- TOGHYANI, Majid et al. Performance, immunity, serum biochemical and hematological parameters in broiler chicks fed dietary thyme as alternative for an antibiotic growth promoter. **African Journal of Biotechnology**, v. 9, n. 40, p. 6819-6825, 2010.
- TUREK, Claudia; STINTZING, Florian C. Stability of essential oils: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 1, p. 40-53, 2013.
- ULU, Hasret. Evaluation of three 2-thiobarbituric acid methods for the measurement of lipid oxidation in various meats and meat products. **Meat Science**, v. 67, n. 4, p. 683-687, 2004.
- UPADHYAY, A., et al.. Combating Pathogenic Microorganisms Using Plant-Derived Antimicrobials: A Minireview of the Mechanistic Basis. **BioMed Research International**, v. 2014, 18p, 2014.
- USDA. United States Department of Agriculture. Food Safety and Inspection Service. 2012. Disponível em: <http://www.fsis.usda.gov/wps/portal/fsis/topics/data-collection-and-reports/microbiology/annual-serotyping-reports>. Acesso em: 24 de outubro de 2015.

- VALENZUELA, Alfonso; SANHUEZA, Julio; NIETO, Susana. Natural antioxidants in functional foods: from food safety to health benefits. **Grasas y aceites**, v. 54, n. 3, p. 295-303, 2003.
- VARDAR-ÜNLÜ, Gülhan et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 1, p. 63-67, 2003.
- VASCONCELOS SILVA, M. G. et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 32-34, 1999.
- VENKITANARAYANAN, K., et al. Use of plant-derived antimicrobials for improving the safety of poultry products. **Poultry Science**, v. 92, n.2, p.493-501, 2013.
- VIEIRA, R. F; et al. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on oil volatile constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 287-304, 2001.
- WALTON, D. E.; MUMFORD, C. J. The morphology of spray-dried particles: the effect of process variables upon the morphology of spray-dried particles. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 77, n. 5, p. 442-460, 1999.
- WANG, Lijun; WELLER, Curtis L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 6, p. 300-312, 2006.
- WANG, Yu et al. Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 3, p. 391-396, 2009.
- WEI, A; SHIBAMOTO, T. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p. 7218-7225, 2010.
- WHITE, D. G., et al. The isolation of antibiotic-resistant salmonella from retail ground meats. **New England Journal Medicine**; v.345, p. 1147-1154, 2001.

- WHO. Word Health Organization. Estimates of the global burden of foodborne diseases, 2010. https://extranet.who.int/sree/Reports?op=vs&path=/WHO_HQ_Reports/G36/PROD/EXT/FoodborneDiseaseBurden. Acesso em: 22 de setembro, 2016.
- WHO. Word Health Organization. Worldwide country situation analysis: response to antimicrobial resistance, 2015. Disponível em: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/publications/situationanalysis/en/>. Acesso em: 10 de fevereiro de 2017.
- WIDDEL, F., 2010. Theory and Measurement of Bacterial Growth. Available in < https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/31475166/Baterial_growth_01.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1502830074&Signature=k1KyAXCV6DZtRrHzS%2Bv8Uw6IAYk%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DBaterial_growth_01.pdf>. Download in: may, 17th, 2015.
- WOJDYŁO, A.; OSZMIAN'SKI, J.; CZEMERYŚ, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v. 105, p. 940–949, 2007.
- WONG, Jon W.; HASHIMOTO, Kelly; SHIBAMOTO, Takayuki. Antioxidant activities of rosemary and sage extracts and vitamin E in a model meat system. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, n. 10, p. 2707-2712, 1995.
- WOOD, J. D. et al. Effects of fatty acids on meat quality: a review. **Meat science**, v. 66, n. 1, p. 21-32, 2004.
- WOOD, J. D.; ENSER, M. Factors influencing fatty acids in meat and the role of antioxidants in improving meat quality. **British Journal of Nutrition**, v. 78, n. 01, p. S49-S60, 1997.
- WOODS, L. F. J.; CHURCH, P. N. Strategies for extending the shelf-life of poultry meat products. In: RICHARDSON, R. I.; MEAD, G. C. Poultry Science Symposium Series. Oxon, U.K. CABI. Publishing. 1999. p. 297-311.
- WU, Yuanfeng et al. Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. **Carbohydrate polymers**, v. 102, p. 497-503, 2014.

- XIAO, S. et al. Effects of diet, packaging, and irradiation on protein oxidation, lipid oxidation, and color of raw broiler thigh meat during refrigerated storage. **Poultry Science**, v. 90, n. 6, p. 1348-1357, 2011.
- YANISHLIEVA, Nedyalka V. et al. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems. **Food Chemistry**, v. 64, n. 1, p. 59-66, 1999.
- YANISHLIEVA, Nedyalka V.; MARINOVA, Emma; POKORNÝ, Jan. Natural antioxidants from herbs and spices. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 108, n. 9, p. 776-793, 2006.
- YOUDIM, K. A.; DEANS, S. G. Effect of thyme oil and thymol dietary supplementation on the antioxidant status and fatty acid composition of the aging rat brain. **British Journal Nutrition**, v. 83, p. 87-93, 2000.
- ZHANG, W., et al. Effects of dietary oxidation on the quality of broiler breast meat. **Animal Industry Report**, v. 657, n. 1, p. 48, 2011.
- ZHANG, Y. et al. Alginate-whey protein dry powder optimized for target delivery of essential oils to the intestine of chickens. **Poultry science**, p. PS3843, 2014.
- ZHAO, S., et al. Antimicrobial resistance and genetic relatedness among salmonella from retail foods of animal: NARMS Retail Meat Surveillance. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 3(1), p. 106-117, 2006.
- ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 49, p. 5165-5170, 2001.
- ZHOU, Feng et al. The antibacterial effect of cinnamaldehyde, thymol, carvacrol and their combinations against the foodborne pathogen *Salmonella typhimurium*. **Journal of Food Safety**, v. 27, n. 2, p. 124-133, 2007.

- APÊNDICE 1 -

ANÁLISE QUÍMICA DA BLENDAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS

1. Objetivo

Determinar a composição química da blenda dos óleos essenciais (BOE) de *T. vulgaris* e *O. gratissium* na proporção 1:3 e quantificar seus compostos majoritários para serem utilizados como referências na padronização do produto final.

2. Material e Métodos

A composição química da BOE foi analisada em cromatógrafo gasoso (Agilent 6890), equipado com HP-5MS e coluna capilar (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) e com interface com detector selectivo de massas (CG-EM) (Agilent 5975). A temperatura foi programada para 60-250 °C a uma velocidade de 3 °C/min. Utilizou-se gás hélio como arraste, a um fluxo de 1 mL/min. Outras condições do instrumento foram as seguintes: voltagem de ionização de 70 (e) V, temperatura do injector 220 °C e temperatura fonte de íons de 200 °C. Os constituintes da BOE foram identificados por comparação de tempos de retenção no CG relativo com base na comparação dos seus espectros de massas, com os resultados obtidos a partir das bibliotecas NIST 98 e Wiley 275, bem como por comparação dos padrões de fragmentação relatados na literatura por Adams (2001). A composição foi reportada como uma percentagem relativa da área total do pico. A quantificação de timol, carvacrol e eugenol foram feitas com os padrões puros (Sigma - Aldrich).

3. Resultados

Através das análises por CG-EM foram identificados os compostos químicos presentes na BOE (Tabela 1), sendo quantificados 38 picos. Deste total, a grande parte pertence ao grupo dos monoterpenos como o timol, carvacrol e eugenol.

Tabela 1. Composição química (%) da blenda de óleos essenciais de *T. vulgaris* e *O. gratissimum* na proporção 1:3.

t_R (min)	IR	Compostos identificados	% relativa
5,79	926	alfa-tujeno	0,54
5,98	933	alfa-pineno	1,32
6,38	947	canfeno	0,83
7,17	976	beta-pineno	0,17
7,54	990	beta-mirceno	0,65
8,00	1005	alfa-felandreno	0,48
8,18	1010	delta-3-careno	0,13
8,40	1016	alfa-terpineno	0,25
8,72	1025	p-cimeno	8,18
8,82	1028	d-limoneno	1,01
8,97	1032	eucaliptol	0,58
9,10	1036	beta-z-ocimeno	1,59
9,86	1057	gama-terpineno	0,33
10,26	1068	hidrato de cis sabineno	0,14
10,96	1087	terpinoleno	0,34
11,49	1102	linalol	1,64
12,55	1127	allo-ocimeno	0,73
13,29	1145	cânfora	0,19
13,76	1157	gama-terpineno	0,48
14,15	1166	borneol	0,93
14,63	1178	terpin-4-ol	1,20
15,20	1191	alfa-terpineol	0,30
19,24	1287	isobornil acetato	0,57
19,64	1297	timol	7,05
20,07	1307	carvacrol	8,40
21,78	1348	alfa-cubeneno	0,22
22,53	1366	eugenol	46,45
22,97	1376	alfa-copaeno	1,66
23,33	1385	beta-bourboneno	0,67
24,12	1404	longifoleno	0,23
24,76	1419	z-cariofileno	4,29
25,09	1427	beta-gurjuneno	0,31
26,06	1452	alfa-humuleno	0,37
27,02	1475	gama-muuroleno	0,89
27,22	1480	germacreno-D	2,42
27,94	1498	alfa-muuroleno	0,31
28,48	1512	gama-cadineno	0,50
28,87	1522	delta-cadineno	1,83
TOTAL		38 compostos	

Tr – tempo de retenção; IR – índice de retenção

O óleo essencial da espécie *Thymus ssp*, designado como óleo de tomilho, é reconhecido pelo seu alto teor de timol (CONSENTINO et al., 1999; SARTORATO et al., 2004; BOZIN et al., 2006; PEREIRA da ROCHA et al., 2012). Além do timol, é comum a determinação de níveis elevados de *p*-cimeno (CONSENTINO et al., 1999; WEI, SHIBAMOTO, 2010) e de carvacrol (SACCHETTI et al., 2005; ROMANE et al., 2012), apesar do timol ser característico para a espécie *vulgaris* (LEE et al., 2005). O *p*-cimeno e alfa-pineno são precursores do timol e carvacrol (POULOUSE; CROUTEAU, 1978, CONSENTINO et al., 1999, BURT, 2004), que são estruturalmente muito semelhantes, tendo apenas a posição do grupo hidroxila em um local diferente no anel fenólico. Isto explica, em parte, as variações encontradas entre estes compostos, já que fazem parte de um processo de biossíntese, podendo variar suas concentrações de acordo com o nível de maturidade da planta no momento da colheita (HUDAIB et al., 2002).

O eugenol foi o composto majoritário analisado na espécie de *Ocimum gratissimum* (Tabela 1), concordando com outros autores que o identificaram nesta mesma espécie (VASCONCELOS SILVA et al., 1999; VIEIRA et al., 2001; FREIRE et al., 2006; PEREIRA, MAIA, 2007). Assim como relatado para as variações no valor do timol presente no óleo essencial de tomilho, o óleo essencial de alfavacão, como é conhecido no Brasil, pode também apresentar variações com relação à sua quantidade de eugenol. Porém, este sempre se mantém como o composto majoritário.

Variações dos teores na composição dos mesmos óleos é um fato amplamente relatado pela literatura. As razões para esta variabilidade podem ser compreendidas se levarmos em conta todos os fatores que influenciam a composição química dos óleos, como condições climáticas e geográficas, sazonalidade, radiação solar, maturidade da planta no período da colheita, técnicas de extração do óleo, dentre outras variáveis (VASCONCELOS SILVA et al., 1999; JERKOVIC et al., 2001; FREIRE et al., 2006; CELIKTAS et al., 2007; CHANG et al., 2008; HUSSAIN et al., 2008). Até mesmo a existência de quimiotipos de mesma variedade afeta de forma expressiva o perfil fitoquímico dos óleos (CHARLES; SIMON, 1992; VIEIRA et al., 2002; LAHLOU; BERRADA, 2003).

Conhecendo a composição química destas espécies e da proporção de 1:3 na formação da blenda, era de se esperar que o principal composto majoritário identificado fosse o eugenol (46,45 %), seguido pelo carvacrol (8,40 %), *p*-cimeno (8,18 %) e timol (7,05 %).

A partir dos padrões puros, foram determinadas as análises quantitativas de cada um dos principais componentes da blenda de óleos, sendo para o *O. gratissimum*, o eugenol com teor de 48,23 % e, para o *T. vulgaris*, o timol com 21,16 % e o carvacrol com 26,28 %. Com esta quantificação detalhada, foi possível validar os níveis mínimos necessários para a caracterização da blenda, sendo assim composta por 1 parte de timo l+ carvacrol e 3 partes de eugenol. Esta caracterização dos compostos pode ser utilizada como marcador químico na padronização de um produto comercial, uma vez que, como citado anteriormente, a variação na composição dos óleos é grande e comum, pois é afetada por muitos fatores difíceis de serem controlados rigorosamente.

Importante ressaltar que este produto (BOE) foi a mesmo utilizado no ensaio de *Salmonella* apresentado no Capítulo 3 e nos ensaios antioxidantes apresentados no Capítulo 4.

4. Referências

- ADAMS, R. P. Identification of essential oils by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy. **Allured: Carol Stream, IL**, 2001.
- BOZIN, Biljana et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1822-1828, 2006.
- BURT, Sara. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods—a review. **International journal of food microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CELIK TAS, O. Yesil et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, v. 100, n. 2, p. 553-559, 2007.
- CONSENTINO, S. et al. In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian *Thymus* essential oils. **Letters in applied microbiology**, v. 29, n. 2, p. 130-135, 1999.
- CHANG, Xianmin; ALDERSON, Peter G.; WRIGHT, Charles J. Solar irradiance level alters the growth of basil (*Ocimum basilicum* L.) and its content of volatile oils. **Environmental and Experimental Botany**, v. 63, n. 1, p. 216-223, 2008.

- CHARLES, Denys J.; SIMON, James E. A new geraniol chemotype of *Ocimum gratissimum* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 4, n. 3, p. 231-234, 1992.
- FREIRE, Cristiana M. Murbach; MARQUES, Márcia Ortiz M.; COSTA, Mirtes. Effects of seasonal variation on the central nervous system activity of *Ocimum gratissimum* L. essential oil. **Journal of ethnopharmacology**, v. 105, n. 1, p. 161-166, 2006.
- HUDAIB, Mohammad et al. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 29, n. 4, p. 691-700, 2002.
- HUSSAIN, Abdullah Ijaz et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food chemistry**, v. 108, n. 3, p. 986-995, 2008.
- JERKOVIĆ, Igor; MASTELIĆ, Josip; MILOŠ, Mladen. The impact of both the season of collection and drying on the volatile constituents of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* grown wild in Croatia. **International journal of food science & technology**, v. 36, n. 6, p. 649-654, 2001.
- LAHLOU, Mouhssen; BERRADA, Rached. Composition and nematicidal activity of essential oils of three chemotypes of *Rosmarinus officinalis* L. acclimatized in Morocco. **Flavour and fragrance journal**, v. 18, n. 2, p. 124-127, 2003.
- PEREIRA DA ROCHA, Ronicely et al. Influência do processo de secagem sobre os principais componentes químicos do óleo essencial de tomilho. **Revista Ceres**, v. 59, n. 5, 2012.
- PEREIRA, Cíntia Alessandra Matiucci; MAIA, June Ferreira. Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtidos das folhas de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.). **Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, 2007.
- POULOSE, A. J.; CROTEAU, Rodney. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 187, n. 2, p. 307-314, 1978.

- ROMANE, Abderrahmane; HARRAK, Rajae; BAHRI, Fouad. Use thyme essential oils for the prevention of salmonellosis. In: **Salmonella-A Dangerous Foodborne Pathogen**. InTech, 2012.
- SACCHETTI, Gianni et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food chemistry**, v. 91, n. 4, p. 621-632, 2005.
- SARTORATO A., et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p.273-280, 2004.
- VASCONCELOS SILVA, M. G. et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70, n. 1, p. 32-34, 1999.
- VIEIRA, R. F; et al. Genetic diversity of *Ocimum gratissimum* L. based on oil volatile constituents, flavonoids and RAPD markers. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 29, p. 287-304, 2001.
- WEI, A; SHIBAMOTO, T. Antioxidant/lipoxygenase inhibitory activities and chemical compositions of selected essential oils. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v. 58, p. 7218-7225, 2010.

- APÊNDICE 2 -

MICROENCAPSULAÇÃO DA BLENDAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS

1. Objetivo

Microencapsular por *spray-dryer* a blenda de óleos essenciais (BOE) composta por uma parte de *T. vulgaris* e três partes de *O. gratissimum* (proporção 1:3) para adicionar nas dietas de frangos de corte e para incorporação na matriz cárnea. O resultado esperado é de um produto mais homogêneo e de facilidade de manuseio, além da preservação dos compostos voláteis presentes nos óleos essenciais.

2. Material e Métodos

2.1. Processo de microencapsulação

Para o processo de microencapsulação utilizou-se como agente encapsulante, para formar o material de parede, a maltodextrina (marca MorRex 1910® com DE 10; DE= dextrose equivalente), da Corn Products (Mogi Guaçu, SP, Brasil). Para a emulsificação da BOE e incorporação à maltodextrina foi utilizado o polisorbato Tween 80 (Sigma – Aldrich). Nesta etapa, a maltodextrina foi dissolvida em água destilada com a ajuda de um Ultra Turrax (IKA T1, Breisgau, Alemanha). A BOE e o agente emulsificante (Tween 80) foram adicionados à preparação e homogeneizados, mantendo-se a proporção 20:80 (BOE:maltodextrina). Após a homogeneização, o resultado final da formulação foi composta por 30 % de sólidos totais (BOE + maltodextrina) e 70 % de água, sendo que o agente emulsificante compreendeu, em média, 10 % dos sólidos totais.

Através de estudos preliminares conduzidos por Rodrigues (2004) foram definidas condições ótimas de operação de um mini *spray dryer* (modelo Büchi B-290), com as seguintes especificações: temperatura de entrada do ar de secagem a 180 ± 5 °C e do ar de saída a 110 ± 5 °C, aspirador a 90 % (35 m³/h) e bomba a 15 % (4,5 mL/min). O gás de arraste utilizado foi o N₂. A formulação resultante ficou sob agitação em placa durante todo o processo de atomização no *spray dryer*. Esta planta de processamento e o equipamento se pertencem à Divisão de Química de Produtos Naturais do CPQBA (UNICAMP – Campinas, SP). As etapas do processamento por *spray drying* estão ilustradas na Figura 1.

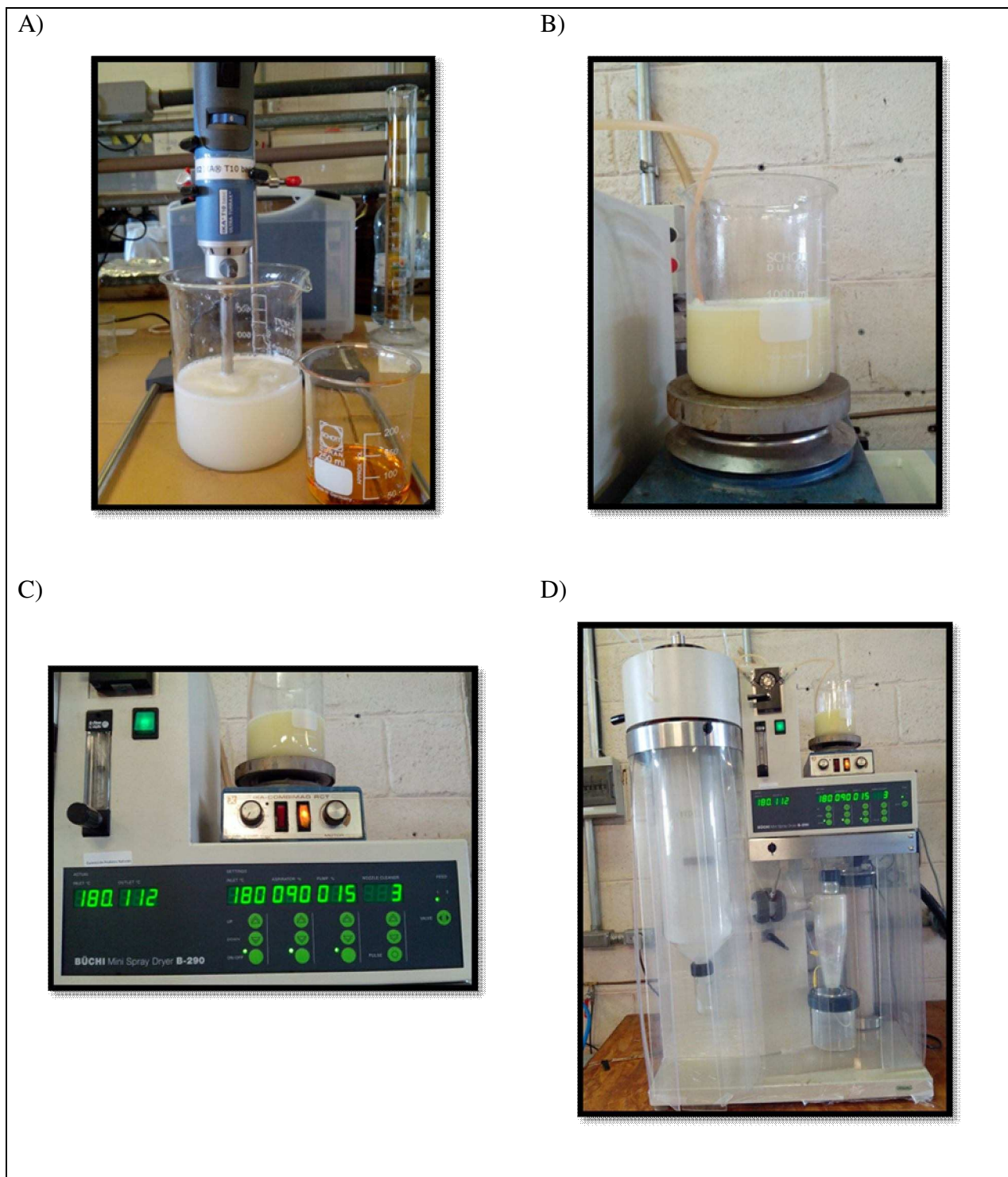


Figura 1. Etapas do processo por *spray drying* da BOE. (A) Agitação de maltodextrina + água (líquido branco e BOE (líquido amarelo); (B) Formulação pronta para atomização no *spray dryer*; (C) Condições operacionais do processo de *spray drying*.; (D) Equipamento *spray dryer* em funcionamento.

2.2. Rendimento e avaliação do processo de encapsulação

Este procedimento foi realizado para determinar a quantidade de óleos essenciais presente na parte externa e interna da microcápsula. Como não há uma metodologia específica para esta técnica, à mesma foi baseada em conceitos de Química Analítica.

Camada externa: Para a extração da porcentagem da BOE presente na parte externa da microcápsula, uma amostra de 5 ± 1 g das micropartículas foi misturada com 100 mL de cloreto de metileno P.A (Synth) e mantida sob agitação durante 1 h. Após este período, a solução foi filtrada e o material retido no filtro foi separado para a segunda parte da extração (camada interna). A parte líquida filtrada foi evaporada em evaporador rotativo (Rotavapor R-100, BUCHI) à temperatura de 45 °C, sob vácuo. O valor final expressou a porcentagem da BOE presente na camada externa da microcápsula.

Camada interna: O sólido obtido na primeira extração (material retido no filtro) foi colocado em estufa a 35 °C durante 20 min, para retirada do provável excesso de umidade externa. Com o objetivo de romper as microcápsulas, uma vez que a maltodextrina é solúvel em água, este material foi pesado na quantidade de 3 ± 1 g e adicionado de 100 mL de água destilada, sob agitação durante 10 min e temperatura que não excedeu 40 °C. Em um funil de separação, foi depositada a solução “microcápsula rompida em água”, seguido de adição de 100 mL de cloreto de metileno. A mistura foi agitada vigorosamente com as mãos durante várias vezes para máxima extração do óleo essencial, a partir das microcápsulas. Em seguida, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo à temperatura de 45 °C, sob vácuo. O valor final expressou a porcentagem da BOE presente na camada interna (núcleo) da micropartícula.

Com estes valores, a Eficiência da Microencapsulação (EM %) foi calculada como: $EM \% = (\text{quantidade total da BOE liberadas a partir das microcápsulas dissolvidas} / \text{quantidade da BOE inicialmente adicionada para o preparo das microcápsulas}) \times 100$ (WANG et al., 2009).

Cada procedimento foi realizado em duplicata e o ensaio repetido pelo menos duas vezes. A determinação da umidade das micropartículas foi realizada em triplicata através do método de titulação de Karl-Fisher (1935).

3. Resultados

As micropartículas obtidas da BOE de *T. vulgaris* e *O. gratissimum* (1:3) podem ser visualizadas na Figura 2. As Fotos B, C e D foram obtidas em microscópio óptico (marca Zeiss, modelo Axio Imager A2) com câmera Axio Cam e uso do software de captura Axio Vision-AxioVs 40V4.8.2.

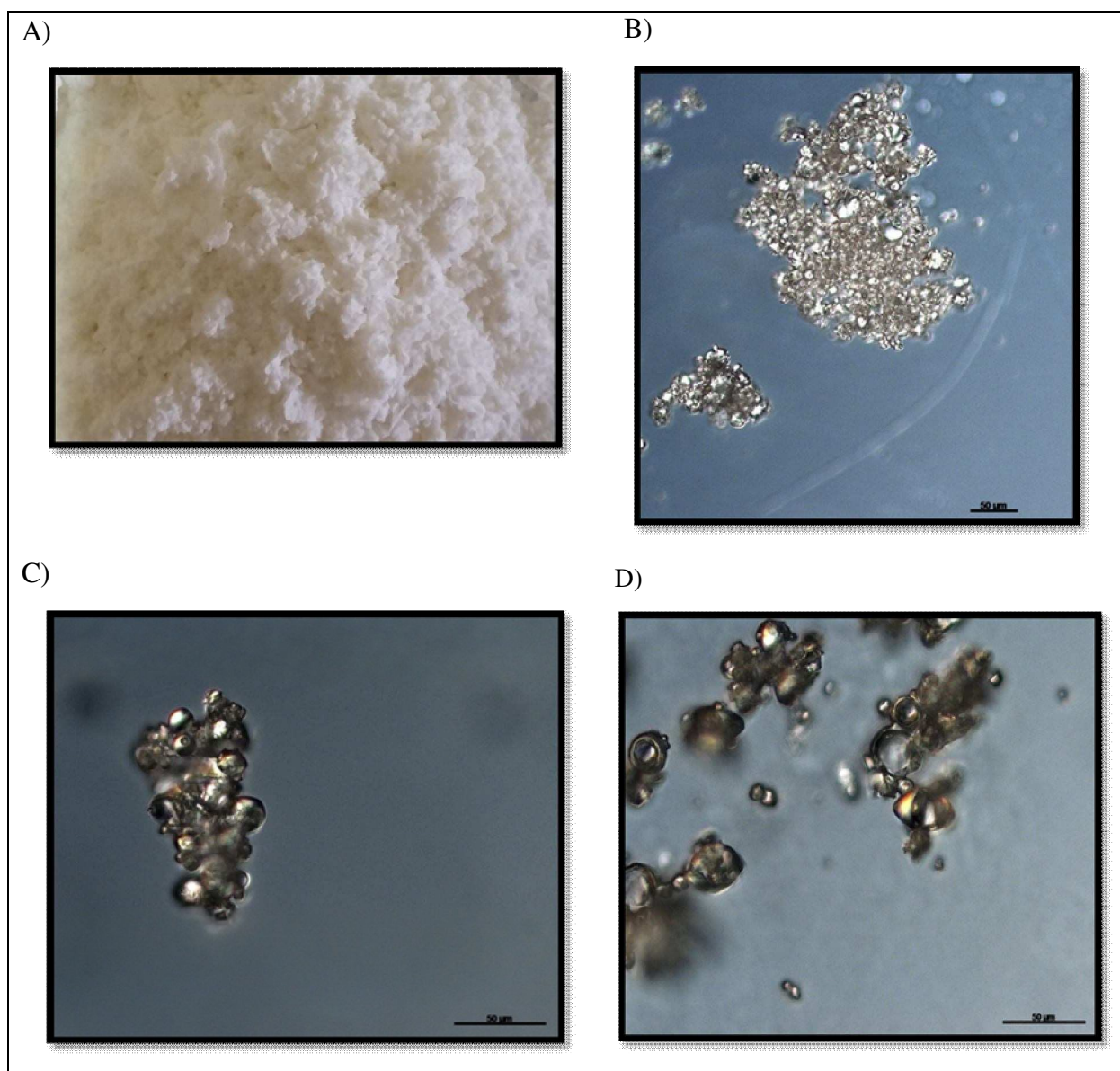


Figura 2. Microscopia de fluorescência das micropartículas obtidas a partir da BOE de *T. vulgaris* e *O. gratissimum*. (A) A olho nu; (B) Aumento de 200 X; (C) e (D) Aumento de 400 X.

O objetivo principal da microencapsulação foi transformar o material líquido (óleos essenciais) em pó, e com isso facilitar o manuseio e a inclusão nas dietas experimentais, além de torná-lo solúvel em água, promovendo uma diluição homogênea em formulações alimentícias. Ademais, o forte sabor e aroma são característicos dos óleos essenciais e o processo de microencapsulação minimiza estas propriedades, sendo também favorável para reduzir a volatilização e aumentar sua vida útil (DE AZEREDO, 2005).

A Figura 2 ilustra as micropartículas logo após o processo de *spray drying* (Foto A) em que o aspecto final é de partículas brancas, uniformes e com pouca ou nenhuma formação de grumos. A Foto B demonstra um aglomerado de micropartículas em aumento de 200 X e as fotos C e D em um aumento de 400 X, onde é possível examinar melhor a existência de uma camada de maltodextrina envolvendo gotículas da BOE, assim como gotículas dispersas da BOE sem envoltório algum. O tamanho é variado, sendo considerada uma média de 50 μm . Fang; Bhandari (2010) relataram que estes tamanhos de partícula são esperados para microcápsulas obtidas através da secagem por *spray dryer*, podendo variar de 10 a 100 μm .

Além da análise por microscopia foram realizados ensaios com o objetivo de extrair e quantificar a BOE presente na camada interna e externa das micropartículas (Tabela 1). Mesmo sendo ensaios empíricos, ou seja, sem a comprovação de uma metodologia científica, as etapas seguiram os princípios da Química Analítica. Os óleos essenciais são substâncias solúveis na presença de solventes orgânicos, como acetato de etila, cloreto de metileno, entre outros, e insolúveis em água; já a maltodextrina é o oposto. Desta forma, optou-se por extrair o óleo externo à maltodextrina com o solvente orgânico. Após esta extração, o sólido resultante foi misturado com água, solubilizando a maltodextrina para liberar a BOE restante; que foi novamente solubilizado em solvente orgânico e analisado.

Tabela 1. Médias¹ dos valores de extração da BOE obtidas na camada externa e interna das micropartículas, eficiência da microencapsulação (EM) e umidade.

Variável	Média, %	CV, %
Extração BOE camada externa	9,24	1,2
Extração BOE camada interna	7,73	3,7
Soma BOE externo+interno, MN*	16,67	-
Umidade	7,04	0.9
Soma BOE externo+interno, MS*	17,93	-
EM², %	83,35	-

¹resultados de duplicatas em dois ensaios distintos.

²EM= (Soma BOE externo + interno calculado / quantidade BOE adicionada) x 100.

*MN= matéria natural; MS= matéria seca.

Os resultados apresentados na Tabela 1 demonstram que a quantidade de óleo presente na camada externa foi maior do que aquele presente na camada interna das microcápsulas. A somatória da BOE foi, em média, de 16,67 % considerando a matéria original e, próximo a 18 %, quando expresso em matéria seca. Entretanto, este valor é inferior a 20 % da BOE que foi adicionada à formulação do produto, resultando em uma Eficiência da Microencapsulação (EM) de 83,35 %. Uma possível explicação pode estar relacionada à perda de compostos por evaporação, uma vez que são substâncias voláteis submetidas à alta temperatura (> 100 °C) e umidade durante processamento por *spray drying*. Mesmo a evaporação da água sendo muito rápida (BERGQUIST, 1982), o que dificulta qualquer dano nas propriedades do produto, Krishnaiah et al. (2012) demonstraram que a temperatura durante o *spray drying* foi um fator impactante na atividade antioxidante do extrato de *Morinda citrifolia*, sugerindo perdas (volatilização) de compostos nas maiores temperaturas (120 – 140 °C). Entretanto, neste mesmo artigo os pesquisadores comprovaram uma menor perda de componentes bioativos voláteis com o uso de quantidade apropriada de maltodextrina, de acordo com as especificações do processamento. Este resultado corrobora com outros autores que avaliaram a secagem por *spray drying* com a utilização da maltodextrina e observaram resultados satisfatórios de proteção dos compostos fenólicos (ROBERT et al., 2010; BAKOWSKA-BARCZAK; KOLODZIEJCZYK,

2011; WU et al., 2014; PANG et al., 2014). No presente trabalho o nível de inclusão de maltodextrina para a formação de material de parede foi de 80 % em relação aos sólidos totais. Desta forma, a presença da BOE na microcápsula foi pequena, como já apresentado na Tabela 1. Nunes et al. (2015) comprovaram que microcápsulas produzidas por *spray drying* com 30 a 40 % de maltodextrina são mais eficientes do que 20 % em preservar os compostos fenólicos presentes na erva mate, melhorando inclusive a estabilidade destes compostos durante o armazenamento. Estes resultados nos orientam a supor que é possível diminuir a inclusão de maltodextrina (80 %) nas microcápsulas, aumentando assim a participação do composto ativo, que é a BOE. Com isto, o produto final seria mais concentrado, permitindo menores níveis de inclusão nas dietas dos animais e na elaboração de produtos cárneos, que são os nossos objetivos. Assim, são recomendados estudos adicionais para encontrar a proporção ideal entre maltodextrina e BOE no processo de *spray drying* e, assim, tornar o produto mais eficiente.

Importante ressaltar que este produto (BOE) foi o mesmo utilizado no ensaio de *Salmonella* apresentado no Capítulo 3 e nos ensaios antioxidantes apresentados no Capítulo 4.

4. Referências

- BAKOWSKA-BARCZAK, Anna M.; KOLODZIEJCZYK, Paul P. Black currant polyphenols: Their storage stability and microencapsulation. **Industrial Crops and Products**, v. 34, n. 2, p. 1301-1309, 2011.
- BERGQUIST, Dwight H. **Spray dryer**. U.S. Patent n. 4,358,341, 9 nov. 1982.
- DE AZEREDO, Henriette Monteiro Cordeiro. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, p. 89-97, 2005.
- FANG, Zhongxiang; BHANDARI, Bhesh. Encapsulation of polyphenols—a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510-523, 2010.
- FISCHER, Karl. A new method for the analytical determination of the water content of liquids and solids. **Angew. Chem**, v. 48, n. 394, p. 24, 1935.

- KRISHNAIAH, Duduku; SARBATLY, Rosalam; NITHYANANDAM, Rajesh. Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. **Chemical engineering research and design**, v. 90, n. 5, p. 622-632, 2012.
- PANG, Sook Fun; YUSOFF, Mashitah M.; GIMBUN, Jolius. Assessment of phenolic compounds stability and retention during spray drying of *Orthosiphon stamineus* extracts. **Food Hydrocolloids**, v. 37, p. 159-165, 2014.
- NUNES, Graciele Lorenzoni et al. Microencapsulation of freeze concentrated *Ilex paraguariensis* extract by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 151, p. 60-68, 2015.
- RODRIGUES, R.A.F. (2004). Preparo, caracterização e avaliação funcional de microcápsulas obtidas por spray drying, contendo extrato de café crioucentrado. Tese de Doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.
- WANG, Yu et al. Study on microencapsulation of curcumin pigments by spray drying. **European Food Research and Technology**, v. 229, n. 3, p. 391-396, 2009.
- WU, Yuanfeng et al. Stability and encapsulation efficiency of sulforaphane microencapsulated by spray drying. **Carbohydrate polymers**, v. 102, p. 497-503, 2014.

- ANEXOS -



CEUA/Unicamp

Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA/Unicamp

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto "Atividade anti-Salmonella enteritidis de óleos essenciais suplementados em dietas pra frangos de corte" (protocolo nº 3692-1), sob a responsabilidade de Profa. Dra. Urara Kawazoe / Adriana Nogueira Figueiredo / Marta Cristina Teixeira Duarte, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório (SBCAL) e com a legislação vigente, LEI Nº 11.794, DE 8 DE OUTUBRO DE 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais, e o DECRETO Nº 6.899, DE 15 DE JULHO DE 2009.

A aprovação pela CEUA/UNICAMP não dispensa autorização prévia junto ao IBAMA, SISBIO ou CIBio.

O projeto foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Campinas - CEUA/UNICAMP - em 15 de dezembro de 2014.

Prof. Dr. Alexandre Leite Rodrigues de Oliveira
Presidente

Campinas, 15 de dezembro de 2014.

Fátima Alonso
Secretária Executiva



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
ESCOLA SUPERIOR DE AGRICULTURA "LUIZ DE QUEIROZ"

Av. Pádua Dias, 11 Caixa Postal 9 Piracicaba/SP 13418-900



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

PROTOCOLO N.O 2014-22

PARECER

O projeto "Atividade antimicrobiana e antioxidante de óleos essenciais suplementados em dietas de frangos de corte" que tem como responsável o Prof. José Fernando Machado Menten, foi examinado pela CEUA desta Escola em reunião de 18 de agosto de 2014.

Com base no protocolo experimental apresentado, a CEUA entende que os procedimentos serão realizados de forma a não ferir os princípios éticos na experimentação com animais.

Piracicaba, 18 de agosto de 2014

Prof. Dr. José Fernando Machado Menten
Comissão de Ética no Uso de Animais em Piracicaba
Coordenador CEUA - ESALQ / USP