

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós-Graduação em Zootecnia



DISSERTAÇÃO

***Avaliação *in vitro* de uma combinação de antimicrobianos alternativos sobre a
inibição do crescimento de bactérias patogênicas.***

Camilo Antônio de Freitas Beck

Pelotas, 09 de dezembro de 2024.

Camilo Antônio de Freitas Beck

Avaliação *in vitro* de uma combinação de antimicrobianos alternativos sobre a inibição do crescimento de bactérias patogênicas.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Área do conhecimento: Produção animal/avicultura).

Orientador: Prof. Dr. Fernando Rutz

Pelotas, 09 de dezembro de 2024.

B393a Beck, Camilo Antônio de Freitas

Avaliação in vitro de uma combinação de antimicrobianos
alternativos sobre a inibição do crescimento de bactérias patogênicas.
[recurso eletrônico] / Camilo Antônio de Freitas Beck ; Fernando Rutz,
orientador. — Pelotas, 2024.

39 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em
Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal
de Pelotas, 2024.

1. Ácido butírico. 2. Antibacterianos. 3. Butirato de sódio
microencapsulado. 4. Efeito do pH. 5. Inibição do crescimento. I.
Rutz, Fernando, orient. II. Título.

CDD 636.5089634

Camilo Antônio de Freitas Beck

Avaliação in vitro de uma combinação de antimicrobianos alternativos sobre a
inibição do crescimento de bactérias patogênicas.

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em
Ciências, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia
Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa:

Banca examinadora:

Prof. Dr. Fernando Rutz

Prof. Dr. Victor Fernando Buttow Roll

Prof. Dr. Eduardo Gonçalves Xavier

Prof. Dr. Guilherme Tavares Nunes

Profa. Dra. Aline Arassiana Piccini Roll (suplente)

Minha gratidão:

Ao meu colega de trabalho e orientador Dr. Fernando Rutz, que ao longo da nossa jornada na mesma empresa, sempre me incentivou a buscar o mestrado, e a quem expresso meu profundo reconhecimento.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer ao colega e amigo Dr. Fernando Rutz, quem sempre me motivou a fazer mestrado e depois de tantos trabalhos científicos que promovemos, finalmente, ter um com meu nome.

À professora Gertrudes Corção, a quem eu conheço há 25 anos e que durante este tempo todo disponibilizou seu tempo e seu laboratório, onde desenvolvemos inúmeros estudos, aplicando metodologias inovadoras para explicar o efeito de aditivos probióticos, prebióticos e outros inibidores de patógenos alternativos aos antibióticos promotores de crescimento, inclusive este, tema desta dissertação de mestrado.

Aos meus professores durante o curso de mestrado, pela valorização de minha experiência com experimentação em pesquisas e avaliações a campo com produtos de biotecnologia, quando oportunamente pediam para eu compartilhar um pouco da minha experiência com os colegas de modo a exemplificar na prática alguns conceitos teóricos.

Especialmente, agradeço ao professor Victor, que se dedicou e me ajudou nos modelos estatísticos mais adequados para avaliação dos resultados deste estudo, de modo que ao final pudéssemos definir que a melhor alternativa seria trabalhar com a estatística descritiva.

Agradeço a empresa Alltech, aos diretores no Brasil, Clodys Menacho e na América Latina, Paulo Rigolin, por autorizar a realização deste estudo com um produto da empresa Alltech, tema desta dissertação.

Ao amigo e colega de trabalho, Felipe Fagundes, que viabilizou este estudo e a quem conheço desde o tempo de colégio, sendo que depois fomos colegas na Faculdade de Agronomia, onde nos graduamos e finalmente trabalhamos na mesma empresa, hoje por mais de 20 anos. Agradeço a ele pela confiança nas propostas para desenvolver métodos para explicar e diferenciar os produtos e com isso motivar a equipe de trabalho com soluções novas.

A minha amada mãe, mãe de 11 filhos, hoje com 98 anos, que apesar da responsabilidade que Deus lhe reservou, sempre foi um exemplo de força e de como se comportar frente aos momentos mais difíceis da vida. Agradeço ao meu pai, já falecido, por ter me estimulado a fazer o que gosto, por ter me transmitido a importância de ser justo, íntegro e ético, em qualquer situação.

Finalmente, agradecer o apoio e incentivo dos meus filhos, Pedro e Matheus, de quem me orgulho pelas pessoas boas que se tornaram e minha netinha querida Leticia. Gostaria de deixar a mensagem de que quando a gente faz o que gosta, faz com prazer e segundo *Aristóteles*: “o prazer aperfeiçoa a obra”.

Finalmente agradeço a todos pelo apoio incondicional!

RESUMO

Beck, Camilo. **Avaliação *in vitro* de uma combinação de antimicrobianos alternativos sobre a inibição do crescimento de bactérias patogênicas.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Zootecnia, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2024.

Este estudo avaliou *in vitro* o efeito antibacteriano do produto Viligen®, composto por butirato de sódio microencapsulado, mananoligosacarídeos e zinco orgânico. A capacidade de redução do crescimento bacteriano foi analisada em ausência e presença do composto nas concentrações de 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm e 2000 ppm, em diferentes pHs (4,5, 5,0, 5,5 e 6,0). As bactérias avaliadas foram as gram-negativas *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Heidelberg, e as gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* e *Clostridium* sp. Os resultados demonstraram a presença de efeitos antibacterianos em todas as bactérias analisadas no pH 4,5, independentemente da concentração do composto. Esses achados *in vitro* sugerem que o composto pode reduzir a concentração de patógenos no bolo alimentar na porção superior do trato gastrointestinal de frangos de corte, diminuindo assim o desafio bacteriano e prevenindo distúrbios e infecções intestinais.

Palavras-chave: ácido butírico, antibacterianos, butirato de sódio microencapsulado, efeito do pH, inibição do crescimento.

ABSTRACT

Beck, Camilo. **In vitro evaluation of a combination of alternative antimicrobials on the inhibition of the growth of pathogenic bacteria.** Dissertation (Master's Degree in Science) – Graduate Program in Animal Science, Eliseu Maciel Faculty of Agronomy, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2024.

This study evaluated *in vitro* the antibacterial effect of the product Viligen®, composed of microencapsulated sodium butyrate, mannanoligosaccharides, and organic zinc. The bacterial growth reduction capacity was analyzed in the absence and presence of the compound at concentrations of 500 ppm, 1000 ppm, 1500 ppm and 2000 ppm, at different pHs (4.5, 5.0, 5.5 and 6.0). The bacteria evaluated were the gram-negatives negative *Escherichia coli*, *Salmonella* Typhimurium and *Salmonella* Heidelberg, and the gram-positives *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* and *Clostridium sp.* The results demonstrated the presence of antibacterial effects in all bacteria analyzed at pH 4.5, regardless of the concentration of the compound. These *in vitro findings* suggest that the compound can reduce the concentration of pathogens in the food bolus in the upper portion of the gastrointestinal tract of broilers, thereby decreasing bacterial challenge and preventing intestinal disorders and infections.

Keywords: antibacterials, butyric acid, growth inhibition, microencapsulated sodium butyrate of progressive release, pH effect.

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	11
2.	Revisão bibliográfica.....	13
2.1.	Parede celular de leveduras.....	13
2.1.1.	Mananoligosacarídeos.....	14
2.1.2.	Fração ativa de mananoligosacarídeos	15
2.1.3.	Mecanismo de ação.....	15
2.1.4.	Atividade antibacteriana.....	16
2.1.5.	Atividade sobre o sistema imunológico.....	17
2.2.	Butirato de sódio.....	18
2.2.1.	Microencapsulação.....	19
2.2.2.	Mecanismo de ação.....	21
2.3.	Zinco orgânico.....	22
2.3.1.	Efeito sobre sistema imunológico.....	22
2.3.2.	Efeito sobre a epiderme.....	23
2.3.3.	Efeito sobre a microbiota intestinal.....	24
3.	Materiais e métodos.....	25
3.1.	Composto antibacteriano.....	25
3.2.	Metodologia de referência.....	25
3.3.	Cepas bacterianas.....	25
3.4.	Meio de cultivo.....	26
3.5.	Procedimento de análises.....	26
3.6.	Fator de inibição.....	27
4.	Resultados e discussão.....	28
4.1.	Crescimento bacteriano.....	28
4.2.	Fator de crescimento.....	31
5.	Conclusões.....	35
6.	Referências Bibliográficas.....	36

LISTA DE FIGURAS

Gráfico 1 - Crescimento das bactérias, gram-negativas e gram-positivas, em pH 6,0 dos tratamentos Controle (CT) e Viligen (VG) em diferentes concentrações.....	30
Gráfico 2 - Crescimento das bactérias, gram-negativas e gram-positivas, em pH 5,5 dos tratamentos Controle (CT) e Viligen (VG) em diferentes concentrações.....	30
Gráfico 3 - Crescimento das bactérias, gram-negativas e gram-positivas, em pH 5,0 dos tratamentos Controle (CT) e Viligen (VG) em diferentes concentrações.....	31
Gráfico 4 - Crescimento das bactérias, gram-negativas e gram-positivas, em pH 4,5 dos tratamentos Controle (CT) e Viligen (VG) em diferentes concentrações.....	31
Gráfico 5 - Fator de inibição de Viligen sobre <i>E.coli</i> , conforme as variações de pH e concentrações.....	33
Gráfico 6 - Fator de inibição de Viligen sobre <i>S.Thyphimurium</i> , conforme as variações de pH e concentrações	33
Gráfico 7 - Fator de inibição de Viligen sobre <i>S.Heidelberg</i> , conforme as variações de pH e concentrações.....	33
Gráfico 8 - Fator de inibição de Viligen sobre <i>S.aureus</i> , conforme as variações de pH e concentrações.....	34
Gráfico 9 - Fator de inibição de Viligen sobre <i>S.epidermidis</i> , conforme as variações de pH e concentrações.....	34
Gráfico 10 - Fator de inibição de Viligen sobre <i>Clostridium sp</i> , conforme as variações de pH e concentrações.....	34
Tabela 1 - Fator de Inibição do produto Viligen em concentrações e condições de pH.....	28
Tabela 2 - Fator de Inibição do produto Viligen em concentrações e condições de pH.....	28

1. Introdução

Os grandes avanços da avicultura nas últimas décadas como na área genética, nutrição, sanidade, modernização de equipamentos e instalações, permitiram maior produção de carne/m² e maior produtividade, o que assegurou ao setor competitividade. Entretanto, essa forte intensificação da produtividade também é dependente do uso fármacos e a utilização de medicamentos com fins terapêuticos e de profilaxia tornou-se uma prática bastante comum na nutrição animal (Regitano et al., 2010).

Dos fármacos utilizados na avicultura, os antibióticos correspondem a uma das classes mais prescritas. O seu uso foi permitido pelos órgãos reguladores sem prescrição de médicos veterinários, passando a ser utilizado na alimentação animal de forma indiscriminada (Thiele-Bruhn, 2003).

O uso prolongado de antibióticos promotores de crescimento em sub doses nas rações, resulta na redução da ação das doses terapêuticas de antibióticos, bem como gera resistência cruzada e bactérias multirresistentes. Além disso, gera perturbações na microbiota normal do trato gastrointestinal, com repercussões no metabolismo de substâncias endógenas e exógenas, e maior susceptibilidade a patógenos (Pessanha et al., 2001).

Em vista deste quadro, ocorreram avanços importantes na área de gestão sanitária na produção avícola. Entre os progressos sanitários, a substituição dos antibióticos promotores de crescimento por produtos alternativos hoje é uma realidade. A adoção de produtos alternativos aos antibióticos nas rações animais reflete a conscientização de técnicos e produtores sobre os problemas com o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos (Gheisar M. M. et al., 2015).

Embora seja possível reduzir a contaminação por patógenos como *Salmonella*, *Clostridium* e *E.coli* em matérias primas, água de bebida, fábricas de ração e camas reutilizadas através de manejo adequado é crucial controlar e monitorar esses patógenos no trato gastrointestinal (Lourenço et al., 2015). As alternativas aos antibióticos incluem probióticos, prebióticos, pós-bióticos, bacteriófagos, ácidos orgânicos, fitoterápicos antibacterianos, óleos essenciais e minerais orgânicos, promotores da saúde intestinal, da microbiota benéfica e das defesas naturais do organismo.

O presente estudo tem por finalidade avaliar *in vitro* a capacidade antibacteriana especificamente do butirato de sódio presente na composição do aditivo antibacteriano em questão. Será aplicada ao composto a metodologia de Sun et al. (1998) desenvolvida na Universidade de Auckland na Nova Zelândia. No referido estudo, os autores concluíram que a inibição pelo ácido butírico é dependente não só pH do meio, mas também da concentração e observaram variações quanto a sensibilidade entre as espécies bacterianas testadas e estes serão os focos deste estudo.

2. Revisão Bibliográfica

A presente revisão abrangerá a descrição das principais características e o mecanismo de ação dos componentes do produto composto por 3 aditivos: fração ativa de mananoligosacarídeos, butirato de sódio microencapsulado de liberação progressiva e zinco orgânico. Os três aditivos com efeitos sobre a microbiota, fisiologia e a imunidade do trato gastrointestinal. (Santin et al., 2001; kim et al., 2011; Gammoh e Rink, 2017, De Grande et al., 2016; Corrigan et al., 2018, Leigh et al., 2022).

2.1 Parede Celular de Leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*)

As primeiras investigações cerca da parede celular de fungos unicelulares datam de 1894, quando Salkowski pesquisou materiais insolúveis remanescentes da extração de leveduras de panificação, (*Saccharomyces cerevisiae*), com hidróxido de sódio diluído a quente (Perkins et al., 1968).

No ambiente natural as leveduras são encontradas no solo, nas plantas e na superfície do organismo e no intestino dos animais terrestres, convivendo em perfeito equilíbrio com outros microrganismos como fungos, bactérias, vírus e protozoários. As interações entre organismos que habitam o mesmo ecossistema podem ser de classificadas em diferentes tipos, tais como: simbiose, predação, competição, mutualismo e decomposição (Groom et al., 2017).

Os polímeros da parede celular das leveduras têm várias funções como proteção física, estabilidade osmótica, suporte de enzimas, adesão célula/célula e barreira de permeabilidade seletiva. Além disso, promove rigidez e transporte de nutrientes para o citoplasma, proporcionando a integridade, o metabolismo e o crescimento celular (Stratford, 1994). A parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* corresponde a cerca de 15 a 25% do peso seco celular. Através de estudos realizados com microscopia eletrônica foi observada a disposição em camadas dos polissacarídeos da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* (Cabib et al., 1997). A camada mais interna é constituída principalmente por β -(1 $\rightarrow$ 3)-D glucanas podendo variar em relação ao grau de maturação da célula. Os demais constituintes da camada interna observados foram a quitina, presente em proporções reduzidas nas regiões de cicatrizes de brotamento, e uma β -(1 $\rightarrow$ 6)-D-glucana altamente ramificada.

Finalmente, na camada externa encontram-se principalmente as mananas, constituídas por uma cadeia principal de α -(1 $\rightarrow$ 6)-D-manopirranose altamente ramificada. As ramificações foram caracterizadas como cadeias laterais de comprimentos variados de unidades de manose α -(1 $\rightarrow$ 2) e em menor proporção α -(1 $\rightarrow$ 3) ligadas, distribuídas de forma complexa ao longo da cadeia principal (Fleuri et al., 2005).

A composição específica da parede celular das leveduras é dependente da espécie, do meio de cultivo, do processo de fermentação e extração dos componentes (Aguilar-Uscanga et al., 2003). Para alguns microrganismos, a fonte de carbono determina a quantidade de polissacarídeo formado, bem como a qualidade do produto. A manipulação da composição do exopolissacarídeos (EPS) por modificação no meio de cultivo é um mecanismo possível pelo qual as propriedades do polímero podem ser alteradas para aplicação final (Corradi da Silva et al., 2006).

2.1.1 Mananoligosacarídeos

A camada externa da parede celular de *Saccharomyces cerevisiae* é composta por grandes moléculas de manano-proteínas mantidas unidas por ligações 1,6-fosfodiéster (Lampen, 1968). As mudanças no conteúdo de manano das paredes celulares de leveduras durante fermentações de cervejas foi correlacionada com o aumento da floculência ou aglutinação (Masschelein et al., 1963). A reação de floculação das paredes celulares resulta na formação de aglomerados de células de levedura a partir de uma suspensão homogênea. A capacidade de floculação das leveduras é uma característica importante no processo de filtração, clarificação e viscosidade das cervejas, além de reduzir o risco de contaminação por bactérias, aumentando a estabilidade das cervejas (Wasmuht, 2024).

Com base no critério de floculação, as cepas de levedura são classificadas como floculantes ou não floculantes. Em uma única cepa de *Saccharomyces cerevisiae*, os níveis de manano presentes na parede dos estágios floculante e não floculante eram aproximadamente os mesmos, enquanto o grau de fosforilação do manano variava (Mill et al., 1964).

Lyons e Hough, (1970) avaliaram a natureza físico-química da floculação, em particular a influência dos íons cálcio e dos grupos fosfatos no comportamento de floculação das paredes celulares. Após separação da parede celular em três frações, em A, B e C, através da etilenodiamina verificaram que a fração A, mais externa, continha 90% de manano e 10% de glucano. A fração B, intermediária, com proporções variáveis de manano e glucano e a fração C, mais interna, rica em glucano retida na matriz essencial da parede celular. Os autores concluíram que a principal diferença quanto a capacidade de floculação da parede celular estava relacionada a fração A, por conter maior conteúdo de fosfato nesta porção mais externa das paredes celulares floculantes.

A maior capacidade de floculação ou aglutinação da fração externa da parede celular de algumas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* é uma característica crítica e a maior ou menor capacidade de ligação da parede celular com células adjacentes depende do grau de fosforilação do manano (Lyons et al., 1971). Da mesma forma, a capacidade de aglutinação com bactérias portadoras de fimbrias Tipo 1 (Corrigan et al., 2018; Leigh et al., 2022).

2.1.2 Mananoligossacarídeos – Fração Ativa

A fração ativa de mananoligosacarídeos são provenientes da fermentação primária de cepas específicas de *Saccharomyces cerevisiae* e obtidas através da extração da porção externa da parede celular rica em mananos ativos. O produto resultante é uma parede celular modificada com maior concentração de mananoproteínas ligadas a radicais fosfatos (Corrigan et al., 2018; Leigh et al., 2022).

2.1.3 Mananoligosacarídeos - Mecanismo de ação

Bactérias gram-negativas como as cepas patogênicas de *E. coli* e *Salmonella* têm uma série de filamentos transversais à sua membrana externa, são chamados de Pili (*pil*- = cabelo). A extremidade do Pilli (ou fimbria) é recoberto por lectinas. Lectinas são proteínas que reconhecem os açúcares das proteínas externas das células eucarióticas e ao se ligarem a receptores de membrana celular viabilizam a colonização e infecção (Lenhinger, 1975, Rayan, 2011).

As interações lectina-carboidrato são altamente específicas e frequentemente multivalentes. Nos sítios de ligação com carboidratos, as lectinas têm uma requintada complementaridade molecular que permite a interação somente com os carboidratos correspondentes corretos. O resultado é uma especificidade extremamente alta nessas interações pelo código dos açúcares (Lenhinger, 1975).

Prebióticos contendo mananos, são suplementos alimentares promissores para aves como alternativa aos antibióticos promotores de crescimento. Eles se ligam eficazmente às fímbrias tipo 1 de patógenos gram-negativos, especialmente Enterobacteriaceae como *Salmonella* e *E.coli*. Ao se ligarem as fímbrias das bactérias, os mananos impedem a fixação e infecção do TGI por estes patógenos, permitindo que a microbiota simbiótica e comensal, prospere (Corrigan et al., 2018; Leight et al., 2022).

Dois dos oligossacarídeos prebióticos mais comumente estudados são fruto-oligossacarídeos e mananoligossacarídeos. Os fruto-oligossacarídeos são encontrados naturalmente em algumas culturas de cereais e cebolas, e os mananoligossacarídeos são obtidos principalmente das paredes celulares da levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) (Bailey et al., 1991).

2.1.4 Mananoligosacarídeos - Atividade antibacteriana

Diversas pesquisas foram realizadas e comprovaram o efeito antibacteriano dos mananoligosacarídeos. A suplementação de mananoligosacarídeos na dieta de frangos de corte reduziu os níveis de excreção fecal de *Salmonella enteridis* após 14 dias do desafio, quando em comparação com os níveis de excreção do grupo não suplementados (Lourenço et al., 2015). Resultados semelhantes também foram encontrados em suínos, com a menor soroprevalência (50%) ao abate, bem como menor contaminação de carcaça com uso da fração ativa de mananoligosacarídeos nos animais em fase de terminação (Costa et al., 2014). Outros resultados semelhantes foram encontrados por Kim et al. (2011), quando em experimento com frangos de corte alimentados com fruto-oligossacarídeos e/ou mananoligosacarídeos, ocorreu um aumento significativo em quantidade e diversidade das populações de lactobacillus, enquanto diminuiu as populações de *E. coli* e *C. perfringens* no íleo.

Desta forma, oligossacarídeos prebióticos reduzem a concentração de bactérias patogênicas e permitem o crescimento e o aumento da diversidade de bactérias benéficas no intestino melhorando a saúde intestinal do hospedeiro.

2.1.5 Mananoligosacarídeos - Atividade sobre o sistema imunológico

Em adição a atividade sobre bactérias portadoras de fimbrias, há evidências de que o mananoligosacarídeos adicionado ao alimento e ao alcançar o intestino é identificado como um corpo estranho pelo sistema imunológico, por ocupar sítios receptores de manose nas glicoproteínas da superfície celular dos macrófagos (Silva et al., 2006). De acordo com Silva, et al., (2010), quando três ou mais destes sítios são ocupados, inicia-se uma ativação da resposta imune adquirida que é caracterizada por uma reação em cascata que culmina na ativação de macrófagos e na liberação de citocinas. Assim, os mananoligosacarídeos são capazes de aumentar os níveis de anticorpos circulantes específicos e a síntese de imunoglobulinas secretórias em resposta à exposição a antígenos (Savage et al., 1997). Na prática, os mananoligosacarídeos são efetivos no aumento de título vacinal, o que otimiza o efeito da vacinação e imunidade adquirida pelos animais imunizados (Shashidhara et al., 2003).

Investigações realizadas por Santin, et al., (2001); kim et al., (2011); Lourenço et al., (2015), evidenciaram o efeito sobre a proliferação de linfócitos. As células do sistema imune são: células apresentadoras de antígenos, linfócitos T, linfócitos B, mastócitos, macrófagos, células NK (natural killer) e linfócitos polimorfonucleares (neutrófilo, eosinófilo e basófilo). Linfócitos T são provenientes das células-tronco e, posteriormente, migram para o timo, onde são selecionados e maturados. Existem três tipos principais de linfócitos T: Helper, também conhecido como CD4; Regulador: também conhecido como T-reg e Citotóxico – também conhecido como CD8. Os linfócitos T CD4. Estas células desencadeiam uma resposta imune quando confrontados com um patógeno, enquanto linfócitos T CD8+ são células do sistema imune adaptativo capazes de induzir a morte de células infectadas através de mecanismos citotóxicos. Resultados com uso de mananoligosacarídeos evidenciaram este efeito sobre a proliferação de linfócitos, com um maior número de células CD4+ e CD8+ e maior

relação CD8+ para CD4+ no íleo e ceco de frangos de corte desafiados por *Salmonella enteritidis*. Como resultado foi observado menor excreção de *S. enteritidis* nas fezes, quando comparado ao grupo controle desafiado com *S. enteritidis*, sem mananoligosacarídeos (Lourenço et al., 2015). Além do efeito antibacteriano e sobre o sistema imunológico, de acordo com Albino et al. (2006) o uso de prebióticos pode reduzir bactérias gram-negativas portadoras de fimbrias Tipo 1 resistentes a antibióticos, observado em bactéria presentes em resíduos avícolas.

Apesar dos benefícios do uso de mananoligosacarídeos alguns trabalhos mostram resultados inconsistentes (Albino et al., 2006; Baurhoo et al., 2009; Kim et al., 2011). Talvez este fato possa ser esclarecido. Os biopolímeros, de maneira geral, têm sido objetos de pesquisas devido ao seu potencial de aplicação. Estudos realizados com os polissacarídeos da parede celular fúngica demonstram que essas moléculas apresentam uma variedade de respostas biológicas de defesa. A sua aplicação terapêutica parece estar relacionada com a estrutura química e a conformação espacial de cada macromolécula. Pequenas diferenças estruturais entre os polímeros resultam características biotecnológicas peculiares (Corradi da Silva et al., 2006).

2.2 Butirato de Sódio

Os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC) contêm de um a sete átomos de carbono, são produzidos principalmente pela fermentação bacteriana de materiais vegetais no intestino. Disponível como sal Na, K, Mg ou Ca, esses sais são geralmente inodoros e mais fáceis de manusear na fabricação de rações devido à sua forma sólida e a baixa volatilidade. Os AGCC atuam de maneira semelhante quando estão na forma ácida ou salina (Guilloteau et al., 2010).

Os principais AGCC são o ácido acético, propiônico e butírico, sendo a maioria presente no trato gastrointestinal (TGI). Como os AGCC são ácidos fracos com um pK_a de $\leq 4,8$ e o pH das câmaras de fermentação do trato gastrointestinal (TGI) é quase neutro, 90-99% dos AGCC do TGI estão como ânions e não como ácidos livres (Bergman, 1990).

Entre os ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), o ácido butírico destaca-se. É uma substância natural encontrada no TGI, leite, suor e fezes de muitos mamíferos e tem sido estudado por suas propriedades anticancerígenas e como fator de crescimento. Seus efeitos variam conforme o modelo experimental, estado das células, grau de inflamação e doses utilizadas (Pender et al., 2000; Inagaki et al., 2005). Além disso, o butirato atua no metabolismo geral dos animais e pode promover crescimento quando adicionado à dieta em baixas doses. A fermentação anaeróbica da microbiota no intestino grosso gera AGCC que fornecem energia ao hospedeiro (Guilloteau et al., 2009).

No útero, o intestino do feto mamífero é estéril. Durante o parto, a microbiota intestinal é adquirida pela ingestão de organismos maternos. Em aves, durante eclosão, a casca tem efeito semelhante e primeiro inóculo pode afetar a vida toda, influenciando o sistema imunológico e a microbiota intestinal (Stark et al., 1982). A composição bacteriana recebida ao nascer, a estrutura do epitélio intestinal e a dieta impactam a densidade e a composição da microbiota. Essa microbiota, especialmente no intestino grosso, fornece energia por meio de processos fermentativos que produzem AGCC (Hold et al., 2002; Duncan et al., 2007). O leite também é uma fonte de butirato, exceto em humanos e porcas, onde apenas vestígios são encontrados. No leite de vaca, a concentração de butirato é de cerca de 0,16 g/l, suficiente para estimular o desenvolvimento gastrointestinal em bezerros recém-nascidos (Alais, 1984), junto com hormônios e fatores de crescimento presentes no leite (Guilloteau et al., 2002). O ácido butírico é liberado e disponibilizado a neonatos lactentes é através da hidrólise dos lipídios do leite pela secreção de lipases salivares durante a amamentação, prevalente em animais jovens como bezerros (Sun et al., 1998; Cunningham, 2014). Em ratos recém-nascidos, níveis altos de butirato são detectados nas células epiteliais do cólon (Krishnan et al., 1998).

2.2.1 Butirato de Sódio - Microencapsulação

O ácido butírico teve seu uso restrito por alguns anos, devido ao odor desagradável e seus efeitos colaterais como cefaleia, náusea e anorexia (Conley et al., 1998; Patnaik et al., 2002). Para evitar estes efeitos o ácido butírico passou a ser

usado na forma de butirato de cálcio ou sódio, com a vantagem de ser líquido ou sólido na forma de pó, o que minimizou o odor. Com o passar dos anos foram desenvolvidas tecnologias de aromatização, microencapsulação e transformação do ácido butírico nas quais o odor e os efeitos colaterais foram praticamente suprimidos (Guilloteau et al., 2010).

A microencapsulação é a técnica que envolve a inclusão de princípios ativos em microesferas utilizando diversos materiais tais como: carboidratos, celulose, gomas, lipídios e proteínas, influenciando a eficiência e estabilidade das micropartículas. Métodos de liberação do princípio ativo do encapsulante variam de acordo com a sensibilidade ao pH, degradação por hidrólise, por difusão, fratura da partícula e a solubilidade ao meio (Pereira et al., 2018).

As vantagens da microencapsulação incluem estabilização, liberação controlada, mascaramento de sabores, odor, redução de toxicidade e proteção de compostos nutricionais. (Favaro-Trindade et al., 2008; Menezes et al., 2013). As microcápsulas podem aumentar a biodisponibilidade e modificar parâmetros farmacocinéticos e distribuição tecidual do medicamento incorporado. (Dianzani et al., 2006).

As micropartículas encapsuladas são classificadas por tamanho em macropartículas, micropartículas e nanopartículas e por morfologia em microcápsulas e microesferas (Bakry et al., 2015; Estevinho et al., 2013). No entanto a micropartícula envolve dois grupos: microcápsula, que compreende um sistema do tipo reservatório e microesfera, um sistema monolítico. Microesferas têm uma estrutura matricial com material ativo livre disperso na superfície do encapsulante, enquanto microcápsulas possuem o material ativo bem definido no centro do encapsulante (Azeredo, 2005; Nazzarro et al., 2012; Nesterenko et al., 2013; Nunes et al., 2015; Pasin et al., 2012; Ray et al., 2016).

O uso de dois tipos de microencapsulação do butirato no mesmo aditivo, permite distribuir a liberação do butirato ao longo do trato gastrointestinal. O tipo microesferas de sistema monolítico permite a liberação do butirato por difusão na porção inicial do trato gastrointestinal. O tipo microcápsula de origem lipídica com sistema reservatório, permite a liberação do butirato na região intestinal, onde ocorrem a secreção de lipases e a liberação do butirato (Pereira et al., 2018).

Fernández-Rubio et al., (2009) investigaram a eficácia do butirato de sódio, tanto na forma parcialmente protegida quanto na forma desprotegida, na prevenção da colonização por *Salmonella enteritidis* em frangos de corte. Prevenção da colonização do TGI, o butirato de sódio, especialmente na forma parcialmente protegida, mostrou-se eficaz na prevenção da colonização do trato gastrointestinal por *Salmonella enteritidis*, reduzindo também a excreção fecal durante as fases tardias da infecção experimental de 21 a 42 dias de vida, beneficiando a saúde das aves ao prevenir a colonização intestinal e sistêmica.

Estudo de Gheisar et al., (2015) demonstrou que a adição de ácidos orgânicos protegidos às dietas de frangos de corte melhorou o desempenho e resultou em contagens fecais crescentes de *Lactobacillus*, sendo benéfico para a saúde intestinal das aves.

2.2.2 Butirato de Sódio - Mecanismo de Ação

Mecanismo proposto por Sun et al., (1998) para explicar a inibição do crescimento bacteriano pelo butirato é baseado na incapacidade da membrana celular evitar a entrada da butirato por difusão para o interior da célula. Quando a concentração de ácido butírico exceder 2–3 mM, a difusão através da célula resultará em acidificação do citoplasma, desacoplamento da força motriz do próton que impulsiona energia para síntese de ATP, devido a formação de prótons a partir da reionização do ácido butírico uma vez na célula. Supõe-se um sistema de transporte de butirato ligado à energia, exportando cátions para fora da célula que fica sobrecarregada pela taxa de difusão do ácido butírico para dentro da célula em pH baixo. Em valores de pH próximos do neutro, se espera que o ácido butírico se equilibre através da membrana. Entretanto, os efeitos tóxicos do ácido butírico sobre as enzimas e na regulação genética ainda são desconhecidos. O efeito bacteriostático do ácido butírico, observado em valores baixos de pH, ocorre quando a entrada por difusão sobrecarrega o sistema de exportação. Os resultados obtidos pelos autores são consistentes com sugestões anteriores de que a entrada de butirato ocorre por um processo de difusão.

2.3 Zinco orgânico

O zinco é um oligoelemento nutricional essencial para todas as formas de vida, pois desempenha um papel importante em inúmeros processos biológicos (Faa et al., 2008; Ranaldi et al., 2013; Boaventura et al., 2015). O zinco não só contribui para a síntese, estabilidade e atividade catalítica de muitas proteínas (Stefanidou et al., 2006), mas também influencia o metabolismo de ácidos nucleicos e as respostas imunológicas. Além disso, desempenha um papel importante na cicatrização de feridas e na restauração da integridade dos tecidos danificados (Batal et al., 2001; Jahanian et al., 2015). O zinco também tem efeitos antioxidantes (Gammoh et al., 2017) por ser um cofator da superóxido dismutase/Zn, que desempenha um papel crucial na proteção das células contra radicais de oxigênio (Oteiza, 2012). Finalmente, o zinco garante o crescimento normal, a saúde, fertilidade, desenvolvimento dos ossos e penas e regula o apetite em frangos de corte (Shao et al., 2014; Kwiecien et al., 2017).

2.3.1 Zinco orgânico - Efeitos sobre o sistema imunológico

No sistema imunológico o zinco desempenha papel fundamental, pelo fato das células do sistema imune apresentarem altas taxas de proliferação, e este mineral estar envolvido na tradução, transporte e replicação do DNA. O zinco pode, ainda, afetar o processo de fagocitose dos macrófagos e neutrófilos, interferir na lise celular mediada por células natural killer e ação citolítica das células T. A influência direta do zinco no sistema imune acontece devido a este elemento estimular a atividade de enzimas envolvidas no processo de mitose, como a DNA e a RNA polimerase, timidina quinase, desoxiribonucleotídeo terminal transferase e ornitina descarboxilase. A deficiência de zinco está relacionada com a atrofia do timo, assim como de outros órgãos linfóides e a linfocitopenia em animais e humanos. Evidências experimentais demonstram diminuição na razão CD4:CD8, durante a deficiência de zinco, além da diminuição de precursores de linfócitos-T citotóxicos. A modificação nas proporções de linfócitos pode contribuir para o desequilíbrio do sistema imunológico, afetando sua resposta e sua regulação (Rossi et al., 2007).

Os microminerais estão envolvidos em funções específicas, a nível celular. A suplementação da dieta de frangos de corte com zinco orgânico pode melhorar além

do desempenho, a imunidade que é muito importante principalmente no cenário atual, onde as rações devem ser isentas de antimicrobianos. A mineralização óssea e a resistência de pele reduzem problemas de pernas com consequente redução de refugos e perdas no abatedouro, que podem causar prejuízos para produtores que comercializam carcaças inteiras ou cortes especializados para exportação (Rossi et al., 2007).

2.3.2 Zinco orgânico – Efeito sobre a epiderme

O efeito da deficiência de zinco na atividade da collagenase óssea e na renovação do colágeno foi estudado em pintinhos por Tarcher et al., (1980). Os sintomas de deficiência de zinco, evidentes após 8 dias de dieta pobre em zinco, incluíram deformidades na tíbia e diminuição da fosfatase alcalina. O metabolismo do colágeno ósseo foi marcadamente alterado, com redução significativa na síntese e renovação do colágeno. O tempo de meia renovação do colágeno da tíbia foi de 13 dias no controle e 35 dias nos pintinhos com deficiência de zinco. A atividade da collagenase da tíbia foi reduzida em 40-80% nos pintinhos deficientes em zinco em comparação com os pintinhos controle. A heparina aumentou acentuadamente a atividade da collagenase nas tíbias deficientes em zinco, elevando a atividade para níveis de controle. Esses dados mostram que a deficiência de zinco diminui a renovação do colágeno ósseo e provavelmente é responsável pelas deformidades nas pernas observadas em pintinhos com deficiência de zinco.

Rossi et al., (2007) observaram aumento do número de camadas de células epiteliais, maior teor de colágeno, inflamação reduzida da pele, e aumento da resistência da pele de frangos de corte. Os autores concluíram que o zinco orgânico melhora a aparência da carcaça de frangos de corte. Os mesmos autores indicaram que o nível de 45 ppm do zinco orgânico adicionado a uma dieta contendo premix comercial (já com zinco inorgânico) melhorou a qualidade da pele dos frangos de corte. Fallavena (2001) concluiu que a adição de complexo de zinco melhora a cicatrização, aumenta a resistência da pele e melhora o empenamento, além de promover benefícios indiretos no estado de saúde da ave.

2.3.3 Zinco orgânico – Efeito sobre a microbiota intestinal

De Grande et al., (2020) em avaliação sobre o efeito do proteinato de zinco quelatado com aminoácidos (ZnAA) na composição microbiana no íleo não observaram diferença na diversidade bacteriana ou riqueza, mas mostraram uma tendência para uma mudança na composição microbiana. Gêneros únicos pertencentes ao filo Firmicutes foram reduzidos ao suplementar ZnAA sem afetar a abundância relativa geral do filo. Vários gêneros pertencentes ao filo Proteobactéria foram menos abundantes no conteúdo do grupo suplementado com ZnAA em comparação ao grupo sulfato de zinco (ZnS) e abundância relativa geral também foi reduzida. A sua maior concentração de Proteobactéria no tratamento com ZnS pode explicar em parte o menor comprimento das vilosidades e relação entre o comprimento das vilosidades e a profundidade das criptas. Proteobactérias tem sido proposto como uma assinatura microbiana de disbiose intestinal e disfunção epitelial.

O objetivo deste estudo é avaliar *in vitro* o efeito antibacteriano utilizando metodologia específica para ácido butírico, aplicada ao produto Viligen®, composto por butirato de sódio microencapsulado de liberação progressiva, fração ativa de mananoligosacarídeos e zinco orgânico.

3. Material e Métodos

3.1 Composto antibacteriano

O produto Viligen composto por uma combinação de antibacterianos alternativos, cedido pela empresa Alltech do Brasil Agroindustrial Ltda, é composto por butirato de sódio microencapsulado de liberação progressiva, frações ativas de mananoligosacarídeos, provenientes de fração externa da parede celular (*Saccharomyces cerevisiae*) e proteinato de zinco, produzido a partir da quelatação de zinco inorgânico com aminoácidos específicos ou pequenos peptídeos.

3.2 Metodologia de referência

A metodologia utilizada para avaliar o efeito antibacteriano do produto Viligen, está baseada no efeito antibacteriano do ácido butírico. A metodologia esta disponibilizada no estudo de Sun et al., (1998), realizado no Departamento de Química da Universidade de Auckland, na Nova Zelândia. Os autores desenvolveram o método de avaliação da atividade antibacteriana do ácido butírico, com o objetivo entender o efeito do ácido butírico liberado da gordura do leite pelas lipases sublinguais secretadas durante a amamentação de terneiros. Com este objetivo, os autores investigaram a hipótese do ácido butírico ser um fator significativo no controle do crescimento bacteriano no estômago dos animais pré-desmamados.

A metodologia em questão foi replicada no laboratório de Microbiologia do Instituto Ciências Básicas da Saúde, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul/Brasil, para avaliar *in vitro* o efeito antibacteriano do Viligen em diferentes concentrações (0,5 kg/ton, 1kg/ton, 1,5kg/ton e 2kg/ton) e pHs do meio de cultivo de 4,5, 5,0, 5,5 e 6,0.

3.3 Cepas bacterianas

Seis cepas bacterianas foram utilizadas para avaliar os efeitos antibacterianos do produto Viligen. As cepas bacterianas foram obtidas na coleção de microrganismos do Laboratório de Microbiologia do Instituto de Ciências Básicas da Saúde da

Universidade Federal do Rio Grande do Sul: *E. coli*, *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Heidelberg e *Clostridium* sp. (cepas de origem animal), e *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* (cepas de origem humana). As culturas preparadas estavam armazenadas em caldo BHI/Skim milk com glicerol a 15%, a - 20°C.

3.4 Meio de cultivo

As cepas bacterianas foram recuperadas primeiramente em caldo BHI, depois semeadas em meios seletivos diferenciais para obtenção de colônias puras. *E. coli* foi cultivada em ágar EMB, *Salmonella* em ágar XLT4, *Staphylococcus* em ágar Sal Manitol e *Clostridium* em ágar sangue com cultivo em anaerobiose. Após crescimento característico nos meios seletivos diferenciais, foram cultivadas em ágar Trypticaseína de soja, com exceção de *Clostridium* que sempre foi cultivado em ágar sangue.

3.5 Procedimentos de análise

O produto Viligen foi preparado em Caldo Luria Bertani (CLB) nas concentrações de 500, 1000, 1500 e 2000 ppm. Para cada concentração, quatro alíquotas (4,5 ml) ajustadas para os pHs 6,0; 5,5; 5,0 e 4,5 foram testadas. Para ajustar o pH das soluções foi utilizado solução de fosfato dissódico 504 mM (solução alcalina) e ácido cítrico 109 mM (solução ácida). As bactérias foram cultivadas em caldo Luria Bertani (CLB) e cada bactéria foi testada para as 4 concentrações ajustadas nos referidos pHs, ou seja, foram realizadas 16 análises para cada bactéria.

Um inóculo de $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC/ml) das bactérias testadas foi preparado a partir do crescimento em CLB pH $7,0 \pm 0,5$ de 24 horas. O inóculo foi ajustado utilizando o tubo 0,5 da escala de Mcfarland.

As bactérias foram semeadas (1:10 / 0,5 ml em 4,5 ml de meio) nas alíquotas de CLB + Viligen nos diferentes pHs e tratamento controle (CT) em alíquotas de CLB nos diferentes pHs testados. Após 24 horas, diluições seriadas (10⁻¹ a 10⁻⁶) de todos os crescimentos foram realizadas e semeadas em triplicata em ágar Luria Bertani (ALB), mesma composição do CLB acrescentado de ágar para concentração final de

1,5%. Após 24 horas de incubação foi realizada a contagem das colônias viáveis de cada placa, determinado o valor UFC.

3.6 Fator de inibição

Para o cálculo da extensão da inibição do crescimento bacteriano, devido a presença do produto Viligen, a inibição foi expressa como fator de inibição α = média com produto Viligen (VG) (ufc/ml) dividido pela média do controle (CT) (ufc/ml).

$$\alpha = \frac{\text{média ufc/ml tratamento}}{\text{média ufc/ml controle}}$$

Quando observado crescimento completo $\alpha = 1$ e $\alpha = 0$ indica que não foi observado crescimento. Para interpretação dos resultados, foram estabelecidos os seguintes escores para o fator de inibição α :

- Muito alta inibição (<0,20): ++++
- Alta inibição (0,21 a 0,40): +++
- Média inibição (0,41 a 0,60): ++
- Baixa inibição (0,61 a 0,80): +
- Muito baixa inibição (>1,00): -

4. Resultados e Discussão

4.1 Crescimento bacteriano

A Tabela 1 e os Gráficos 1 a 4 mostram o crescimento bacteriano em meios de cultura com diferentes pHs e concentrações do produto.

No tratamento controle (CT), não houve inibição do crescimento das bactérias nos diferentes pH dos meios de cultura. Nos tratamentos com Viligen (VG) foi observado efeito antibacteriano. O produto reduziu substancialmente o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas em pH 4,5. O maior efeito antibacteriano foi nas gram-positivas, indicando maior sensibilidade ao ácido butírico.

A maior sensibilidade das bactérias gram-positivas pode ser explicada devido a parede celular mais simples, composta por mucina, peptidoglicano e mucopeptídeos. O peptidoglicano dessas bactérias é mais espesso (20 a 80 nanômetros) e fica fora da membrana celular. Já as bactérias gram-negativas têm uma camada de peptidoglicano mais fina (2 a 7 nanômetros), situada entre duas membranas, tornando sua parede celular mais complexa e resistente. Essa estrutura complexa das bactérias gram-negativas dificulta a ação de antibióticos, ionóforos e outras substâncias. Essas diferenças estruturais influenciam na suscetibilidade bacteriana a diferentes agentes antibacterianos (Pelczar et al., 1996). Outros autores relatam que a permeabilidade do fármaco na membrana bacteriana é crucial para seu efeito. Alterações na permeabilidade permitem que bactérias resistam à entrada de substâncias tóxicas. Bactérias Gram-negativas são menos permeáveis a muitos antimicrobianos, devido às membranas interna e externa. Alterações nessas regiões podem limitar ainda mais a entrada do antibiótico (Wright, 2011; Blair et al., 2015; Kaneti et al., 2016).

A presença da parede celular no meio de cultura pode favorecer o crescimento bacteriano ou impedir através do mecanismo de aglutinação com *E. coli* e *Salmonella* e interferir nos resultados. O proteinato de zinco pode potencializar o efeito antibacteriano do butirato de sódio. O zinco quelatado não afetou a diversidade microbiana de frangos de corte, mas reduziu significativamente a abundância dos gêneros *Heliobacter*, *Sphingomonas*, *Delftia*, *Ralstonia* e *Pseudomonas* (De Grande

et al., 2020). Apesar das possíveis interferências, os resultados deste estudo são consistentes com Sun et al., (1998), quando concluíram que o efeito antibacteriano do ácido butírico é depende do pH, concentração e das espécies bacterianas.

A presença de Viligen inibiu significativamente o crescimento de *S. aureus* e *S. epidermidis* em pH 5,0, algum crescimento ainda foi observado, enquanto em pH 4,5 nenhum crescimento foi observado. O *Clostridium sp.* não mostrou redução de crescimento em presença do produto nos pH 6,0, 5,5 e 5,0, mas foi altamente sensível ao pH 4,5, quando não foi observado crescimento. Esses resultados estão alinhados com os conceitos de potencial de dissociação dos ácidos (pKa). Quando o pH do meio é igual ao pKa, metade da substância estará dissociada e metade não. Quanto menor o pH em relação ao pKa, maior a dissociação e maior a concentração de hidrogênio livre no meio, aumentando a toxicidade e o efeito antimicrobiano (Lehninger, 1975).

Os resultados indicam que uma dose baixa de butirato é eficaz como antimicrobiano em meios ácidos, mas menos eficaz em ambientes intestinais alcalinos. Nossos resultados mostram o efeito com aumento da dose do produto sobre alguns microrganismos testados e concomitante com o aumento do pH. Sun et al., (1996) também verificaram este efeito. O aumento da concentração do ácido butírico reduziu o crescimento bacteriano em meios ácidos em níveis diferentes de inibição conforme a espécie bacteriana. Estas constatações nos levar a crer que um aumento exagerado da concentração de butirato na alimentação animal, além de reduzir o crescimento de patógenos, também pode afetar a microbiota benéfica do trato gastrointestinal. Esta constatação está alinhada com a recomendação de usar baixas doses de butirato na nutrição animal de forma a atuar no metabolismo geral e promover o crescimento animal (Guilloteau et al., 2009).

Tabela 1: Resultados do crescimento bacteriano em presença do produto Viligen (VG) e controle (CT), em diferentes concentrações e pHs:

Classificação	Bactérias, UFC/ml	Dose produto, ppm	pH							
			6,0 CT	6,0 VG	5,5 CT	5,5 VG	5,0 CT	5,0 VG	4,5 CT	4,5 VG
Gram -	<i>E. coli</i>	500	7,20E+13	3,30E+13	3,10E+13	1,30E+13	2,90E+13	1,30E+13	8,00E+13	7,30E+06
		1000	8,00E+13	5,80E+13	2,50E+13	1,00E+13	6,30E+13	2,90E+13	4,00E+13	2,00E+09
		1500	3,20E+13	2,20E+13	5,50E+13	2,50E+13	9,30E+13	4,00E+13	1,70E+13	3,80E+09
		2000	6,00E+13	4,50E+13	4,30E+13	3,00E+13	8,00E+13	6,70E+13	2,30E+13	8,20E+09
	<i>S. Typhimurium</i>	500	2,00E+16	1,80E+16	9,30E+16	6,50E+16	4,50E+16	4,20E+16	6,50E+16	6,30E+11
		1000	2,40E+16	1,40E+16	6,40E+16	3,90E+16	6,00E+16	1,80E+16	2,90E+16	5,50E+11
		1500	3,50E+16	1,40E+16	3,40E+16	1,50E+16	6,20E+16	2,90E+16	8,50E+16	3,50E+10
		2000	5,50E+16	1,40E+16	5,80E+16	2,40E+16	6,50E+16	1,80E+16	3,50E+16	1,10E+10
	<i>S. Heidelberg</i>	500	9,40E+16	5,80E+16	6,80E+16	4,10E+16	7,80E+16	4,80E+16	7,50E+16	2,70E+11
		1000	5,80E+16	3,20E+16	3,50E+16	2,50E+16	5,00E+16	3,40E+16	4,20E+16	4,50E+11
		1500	8,00E+16	7,00E+16	7,90E+16	7,50E+16	3,30E+16	2,90E+16	6,50E+16	2,50E+10
		2000	3,60E+16	3,00E+16	8,10E+16	7,50E+16	7,50E+16	4,40E+16	5,80E+16	8,00E+07
Gram +	<i>S. aureus</i>	500	6,40E+13	6,00E+13	4,30E+13	4,10E+13	8,00E+13	6,50E+13	8,00E+13	0,00E+00
		1000	6,00E+13	5,50E+13	5,00E+13	4,70E+13	8,40E+13	1,20E+13	7,00E+13	0,00E+00
		1500	7,50E+13	6,00E+13	4,00E+13	2,30E+13	9,00E+13	8,00E+10	6,00E+13	0,00E+00
		2000	9,00E+13	5,80E+13	5,10E+13	2,50E+13	7,00E+13	6,50E+09	5,80E+13	0,00E+00
	<i>S. epidermidis</i>	500	6,80E+17	3,80E+17	4,80E+17	1,70E+17	1,50E+17	3,50E+14	3,50E+17	0,00E+00
		1000	8,10E+17	3,50E+17	6,60E+17	3,00E+17	5,80E+17	4,50E+14	4,80E+17	0,00E+00
		1500	7,80E+17	4,00E+17	7,30E+17	2,20E+17	2,50E+17	6,40E+14	7,50E+17	0,00E+00
		2000	8,40E+17	2,80E+17	4,30E+17	1,50E+17	9,30E+17	1,80E+15	8,40E+17	0,00E+00
	<i>Clostridium sp.</i>	500	6,10E+08	4,50E+08	5,80E+08	2,90E+08	3,50E+08	2,50E+08	4,50E+08	0,00E+00
		1000	3,10E+08	2,40E+08	2,90E+08	2,40E+08	4,80E+08	3,40E+08	2,80E+08	0,00E+00
		1500	3,60E+08	3,00E+08	3,50E+08	2,20E+08	3,40E+08	2,50E+08	1,50E+08	0,00E+00
		2000	3,00E+08	2,10E+08	4,50E+08	3,50E+08	4,30E+08	2,00E+08	8,70E+08	0,00E+00

E.coli: *Escherichia coli*; *S.Typhimurium*: *Salmonella Typhimurium*; *S.Heidelberg*: *Salmonella Heidelberg*; *S.aureus*: *Staphylococcus aureus*; *S.epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis*.

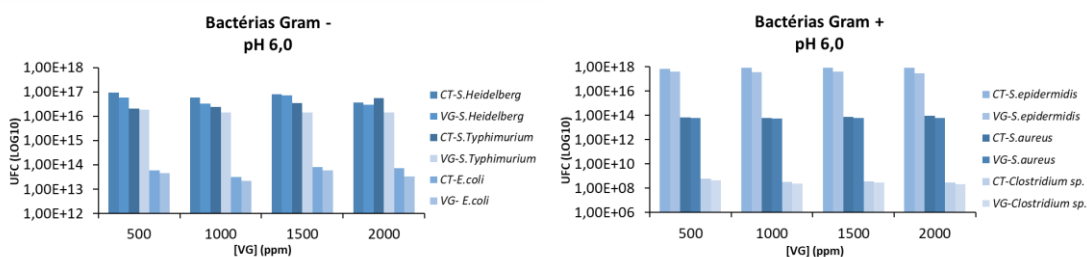


Gráfico 1: Crescimento das bactérias, gram-negativas e gram-positivas, em pH 6,0 dos tratamentos Controle (CT) e Viligen (VG) em diferentes concentrações.

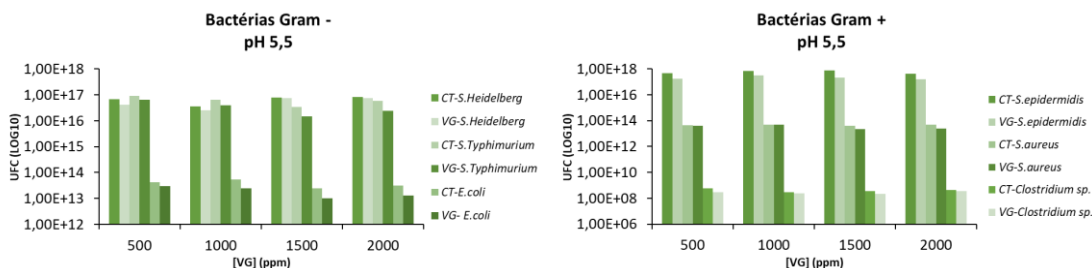


Gráfico 2: Crescimento das bactérias, gram-negativas e gram-positivas, em pH 5,5 dos tratamentos Controle (CT) e Viligen (VG) em diferentes concentrações.

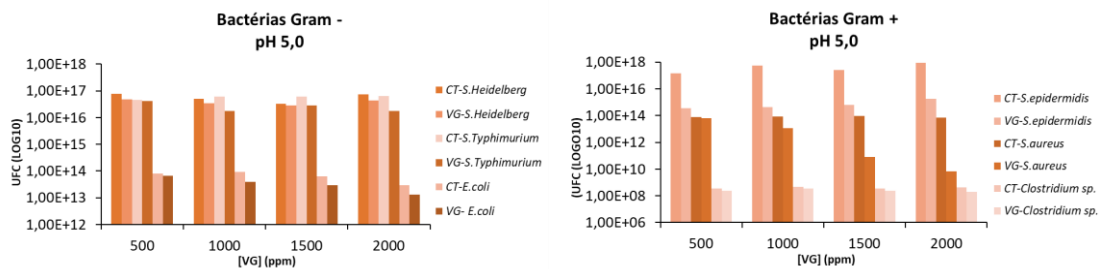


Gráfico 3: Crescimento das bactérias, gram-negativas e gram-positivas, em pH 5,0 dos tratamentos Controle (CT) e Viligen (VG) em diferentes concentrações.

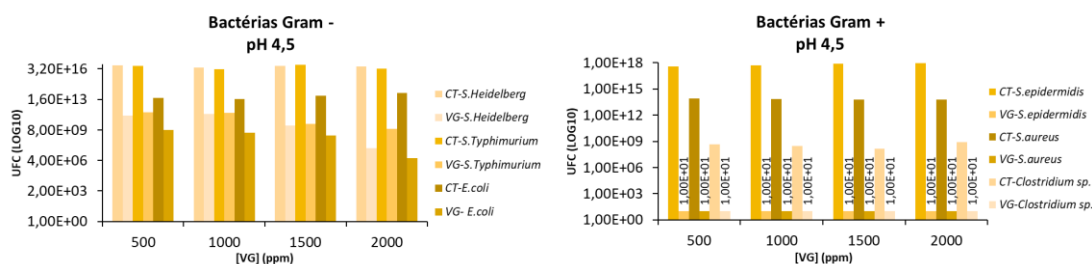


Gráfico 4: Crescimento das bactérias, gram-negativas e gram-positivas, em pH 4,5 dos tratamentos Controle (CT) e Viligen (VG) em diferentes concentrações.

4.2 Fator de Crescimento

Na Tabela 2 e Gráficos de 5 a 10, encontram-se os valores do fator de inibição (α), os respectivos escores para cada bactéria e marcado em vermelho os maiores escores de inibição.

E. coli, teve seu crescimento pouco reduzido nos pH 5,0, 5,5 e 6,0 em presença do produto. Quando em pH 4,5, o crescimento foi inibido com valor muito alto $\alpha=0$.

S. Typhimurium apresentou fator de inibição do crescimento de baixo a muito baixo em pH 6,0, 5,5 e 5,0 na concentração de 500 ppm. Todavia com o aumento da concentração se observa uma tendência a maior inibição do crescimento, com valor $\alpha=0,30$, 0,47 e 0,28, respectivamente, 1000 ppm, 1500 ppm e 2000 ppm. Em pH 4,5 o crescimento foi inibido com fator de inibição muito alto $\alpha=0$.

S. Heidelberg em meio com pH 6,0, pH 5,5 e pH 5,0 e com o aumento da concentração do produto não se observou aumento da sensibilidade da bactéria, o fator de inibição foi de baixo a muito baixo. Em pH 4,5, apesar de ainda ser observado crescimento, o fator de inibição foi muito alto com $\alpha=0$.

S. aureus em meio com pH 6,0, pH 5,5 e pH 5,0 e na concentração de 500 ppm se mostrou resistente com inibição do crescimento muito baixo. Em pH 5,0, a bactéria mostrou sensibilidade com aumento da concentração a partir de 1000 ppm. Em pH 4,5, a inibição foi muito alta com valor $\alpha=0$ e não foi observado crescimento bacteriano.

S. epidermidis, entre as gram-positivas, a bactéria mais sensível com o aumento da concentração do produto e redução do pH. Em pH 4,5, a inibição foi muito alta e não foi observado crescimento.

Clostridium sp., no pH 6,0, pH 5,5 e pH 5,0, entre as gram-positivas foi a bactéria com maior resistência a inibição do crescimento frente a concentração do produto e aumento da acidez do meio, com exceção do pH4,5. A cepa de clostridium testada foi altamente sensível a presença do produto em pH 4,5.

O pH mais ácido (pH4,5) do meio de cultura foi determinante para maior atividade antibacteriana, além de diferente sensibilidade das espécies frente ao pH e a concentração do produto.

Tabela 2: Fator de Inibição do produto Viligen em diferentes concentrações e condições de pH.

Bactérias	Viligen (ppm)	Fator de Inibição (α)			
		pH 6,0	pH 5,5	pH 5,0	pH 4,5
<i>E. coli</i>	500	0,75 +	0,70 +	0,84 -	0,0004 ++++
<i>S. Typhimurium</i>	500	0,90 -	0,70 +	0,93 -	0,0000 ++++
<i>S. Heidelberg</i>	500	0,62 +	0,60 ++	0,62 +	0,0000 ++++
<i>S. aureus</i>	500	0,94 -	0,95 -	0,81 -	0,0000 ++++
<i>S. epidermidis</i>	500	0,56 ++	0,35 +++	0,002 ++++	0,0000 ++++
<i>Clostridium sp.</i>	500	0,74 +	0,50 ++	0,71 +	0,0000 ++++
<i>E. coli</i>	1000	0,69 +	0,45 ++	0,43 ++	0,0002 ++++
<i>S. Typhimurium</i>	1000	0,58 ++	0,61 +	0,30 +++	0,0000 ++++
<i>S. Heidelberg</i>	1000	0,55 ++	0,71 +	0,68 +	0,0000 ++++
<i>S. aureus</i>	1000	0,92 -	0,94 -	0,143 ++++	0,0000 ++++
<i>S. epidermidis</i>	1000	0,43 ++	0,45 ++	0,001 ++++	0,0000 ++++
<i>Clostridium sp.</i>	1000	0,77 +	0,83 -	0,71 +	0,0000 ++++
<i>E. coli</i>	1500	0,73 +	0,40 +++	0,46 ++	0,0001 ++++
<i>S. Typhimurium</i>	1500	0,40 +++	0,44 ++	0,47 ++	0,0000 ++++
<i>S. Heidelberg</i>	1500	0,88 -	0,95 -	0,88 -	0,0000 ++++
<i>S. aureus</i>	1500	0,80 -	0,58 ++	0,001 ++++	0,0000 ++++
<i>S. epidermidis</i>	1500	0,51 ++	0,30 +++	0,003 ++++	0,0000 ++++
<i>Clostridium sp.</i>	1500	0,83 -	0,63 +	0,74 +	0,0000 ++++
<i>E. coli</i>	2000	0,46 ++	0,42 ++	0,45 ++	0,0000 ++++
<i>S. Typhimurium</i>	2000	0,25 +++	0,41 ++	0,28 +++	0,0000 ++++
<i>S. Heidelberg</i>	2000	0,83 -	0,93 -	0,59 ++	0,0000 ++++
<i>S. aureus</i>	2000	0,64 +	0,49 ++	0,000 ++++	0,0000 ++++
<i>S. epidermidis</i>	2000	0,33 +++	0,35 +++	0,002 ++++	0,0000 ++++
<i>Clostridium sp.</i>	2000	0,70 +	0,78 +	0,47 ++	0,0000 ++++

E.coli: *Escherichia coli*; *S.Typhimurium*: *Salmonella Typhimurium*; *S.Heidelberg*: *Salmonella Heidelberg*; *S.aureus*: *Staphylococcus aureus*; *S.epidermidis*: *Staphylococcus epidermidis*.

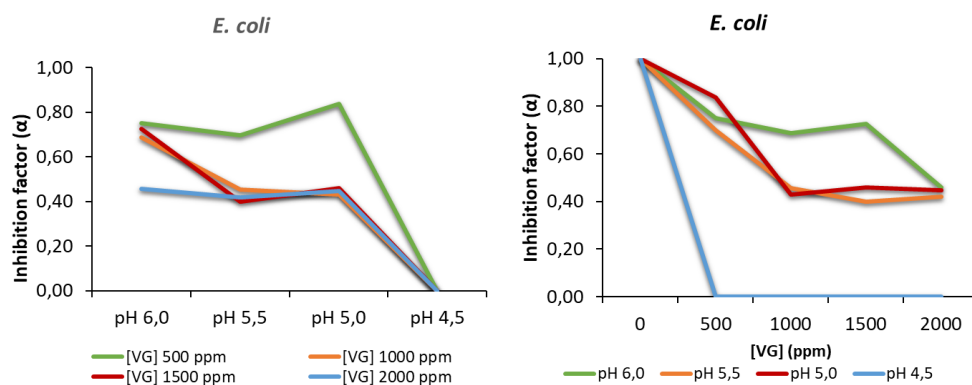


Gráfico 5: Fator de inibição de Viligen sobre *E.coli*, conforme as variações de pH e concentrações.

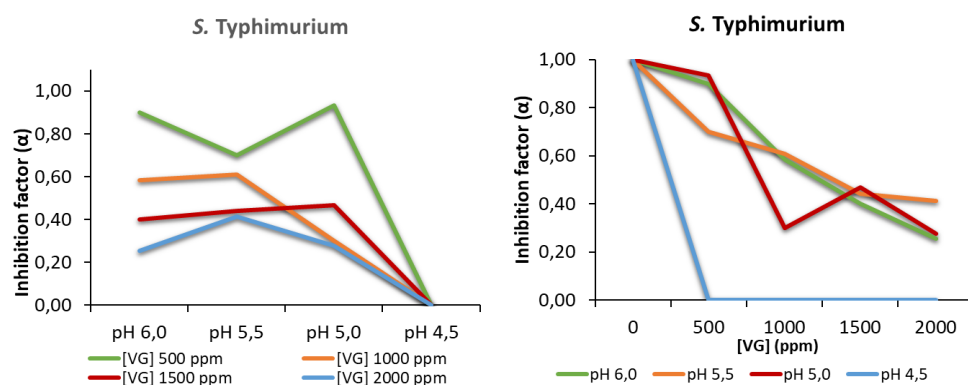


Gráfico 6: Fator de inibição de Viligen sobre *S.Typhimurium*, conforme as variações de pH e concentrações.

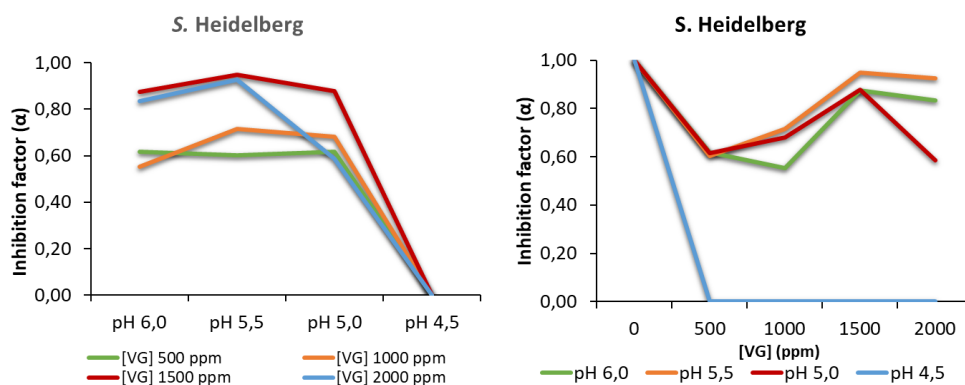


Gráfico 7: Fator de inibição de Viligen sobre *S.Heidelberg*, conforme as variações de pH e concentrações.

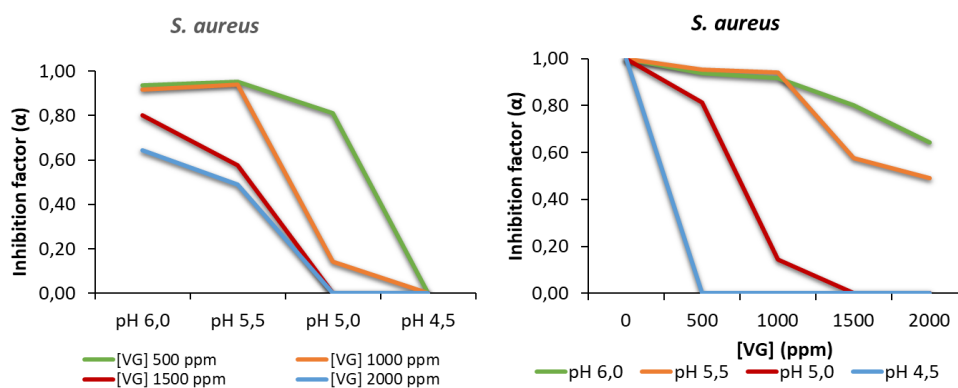


Gráfico 8: Fator de inibição de Viligen sobre *S.aureus*, conforme as variações de pH e concentrações.

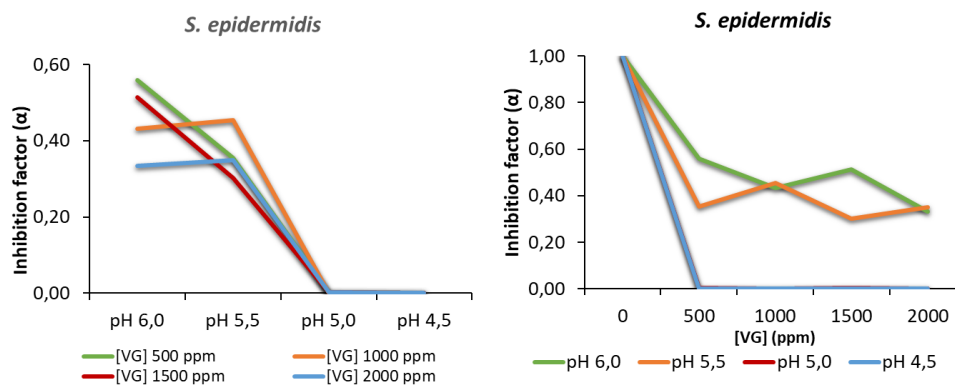


Gráfico 9: Fator de inibição de Viligen sobre *S.epidermidis*, conforme as variações de pH e concentrações.

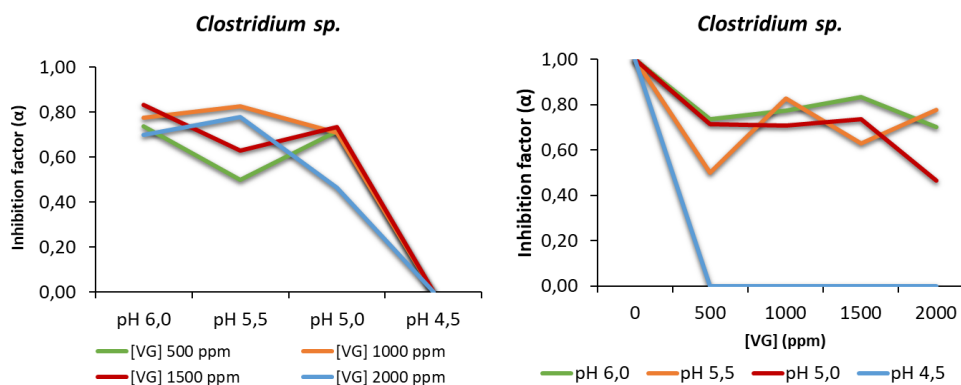


Gráfico 10: Fator de inibição de Viligen sobre *Clostridium sp*, conforme as variações de pH e concentrações.

5. Conclusões

A metodologia aplicada ao produto Viligen obteve efeitos antibacterianos comparáveis aos do ácido butírico no experimento realizado por Sun et al., (1998).

Observou-se efeito antibacteriano substancial em todas as bactérias a um pH de 4,5, especialmente em gram-positivas, quando não foi observado crescimento.

Avaliações futuras *in vitro* devem verificar a repetibilidade destes resultados e investigar possíveis interferências da parede celular e do zinco orgânico na metodologia empregada.

Os resultados obtidos *in vitro* indicam que o produto pode reduzir a concentração de patógenos no trato gastrointestinal superior, durante a transição do alimento para o ambiente intestinal, diminuindo o desafio bacteriano e ajudando a prevenir distúrbios intestinais.

6. Referências Bibliográficas

- AGUILAR-USCANGA, B.; FRANCOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode of cultivation. **Letters in Applied Microbiology, Oxford**, v. 37, n. 3, p. 268–274, 2003.
- ALAIS C., 1984. Science du Lait. Principes des Techniques Laitières (Science of Milk. Principles of Dairy Technology). Paris: **Society Edition et de Promotion Agro-Alimentaire, Industrielle et Commerciale**.
- ALBINO T. L. F.; FERES F. A.; DIONIZIO A. M.; ROSTAGNO S. H. Uso de prebióticos à base de mananoligossacarídeo em rações para frangos de corte. Departamento de Zootecnia da Universidade Federal de Viçosa. R. Bras. Zootec., © 2005 **Sociedade Brasileira de Zootecnia** v.35, n.3, p.742-749, 2006
- BAILEY, J. S., L. C. BLANKENSHIP, AND N. A. COX. 1991. Effect of fructo-oligosaccharides on *Salmonella* colonization of the chicken intestine. **Poult. Sci.** 70:2433–2438.
- BATAL, A. B.; T. M. PARR; D. H. BAKER. 2001. Zinc bioavailability in tetrabasic zinc chloride and the dietary zinc requirement of young chicks fed a soy concentrate diet. **Poult. Sci.** 80:87–90.
- BAKRY, A. M.; ABBAS, S.; ALI, B.; MAJEED, H.; ABOUELWafa, M. Y.; MOUSA, A.; LIANG, L. Microencapsulation of oils: a comprehensive review of benefits, techniques, and applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 1, p. 143-182, 2015. <http://dx.doi.org/10.1111/1541-4337.12179>.
- BAURHOO, B., F.GOLDFLUS, X. ZHAO; 2009. Purified cell wall of *Saccharomyces cerevisiae* increases protection against intestinal pathogens in broiler chickens. **Int. J. Poult. Sci.** 8:133–137.
- BERGMAN E. N.,1990. Energy contributions of volatile fatty acids from the gastrointestinal tract in various species. **Physiol Rev** 70, 567–590.
- BLAIR, J. M. A. *et al.* Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Nature Reviews Microbiology**. v. 13, n. 1, p. 42-51, jan. 2015.
- BONAVENTURA, P., G. BENEDETTI, F. ALBAREDE, AND P. MIOSSEC. 2015. Zinc and its role in immunity and inflammation. **Autoimmun. Rev.** 14:277–285.
- CABIB, E.; DRGON, T.; DRGONOVAA, J.; FORD, R. A.; KOLLAR, R.; **Biochem. Soc. Trans.** 1997, 25, 200.
- CASTELO BRANCO, N.M., ALBERT, A. L. M, ROMÃO, C. M. C.P. A., Poluentes emergentes: Antimicrobianos no ambiente, a educação ambiental e o aspecto regulatório nacional e internacional, **Fundação Oswaldo Cruz, Brasil, Research, Society and Development**, v. 10, n. 8, e16910817083, 2021,(CC BY 4.0) | ISSN 2525-3409 | DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i8.17083>.
- CORRADI DA SILVA, M. L.; MARTINEZ, P. F.; IZELI, N. L.; SILVA, I. R.; VASCONCELOS, A. F. D.; CARDOSO, M. S. Caracterização química de glucanas fúngicas e suas aplicações biotecnológicas. **Química Nova, São Paulo**, v. 29, n. 1, p. 85-92, 2006.
- CORRIGAN, A., RUSSELL, N., WELGE, M., AUVIL, L.; BUSHELL, C., WHITE, B. A., MURPHY R. A. The use of random forests modelling to detect yeast-mannan sensitive bacterial

changes in the broiler cecum. **Sci Rep.**2018;8(1):1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-31438-x>

COSTA F.E., KICH D. J., CORBELINI F. E. Validação de estratégias de campo para o controle de *Salmonella* sp. em suínos. **Plano para controle da Salmonella em suínos; validação, comunicação e transferência de tecnologia.** Embrapa Suínos e Aves – Concórdia/SC-

DE GRANDE A., LELEU S., DELEZIE E, RAPP, C., SMET S., GOOSSENS E, HAESEBROUCK F., VAN IMMERSEEL F., DUCATELLE R. Dietary zinc source impacts intestinal morphology and oxidative stress in young broilers. Department of Pathology, Bacteriology and Avian Diseases, Ghent University, 2020 **Poultry Scienc** **99:441-453**

DIANZANI, C., CAVALLI, R., ZARA, P.G., GALLICCHIO, M., LOMBARDI, G., GASCO, R.M, PANZANELLI, P., FANTOZZ, R. Cholesteryl butyrate solid lipid nanoparticles inhibit adhesion of human neutrophils to endothelial cells , **British Journal of Pharmacology** (2006) 148, 648–656 & 2006 Nature Publishing Group All rights reserved 0007–1188/06

DUNCAN S.H., LOUIS P. & FLINT H.J. 2007. Cultivable bacterial diversity from the human colon. **Lett Appl Microbiol** 44, 343–350.

ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F.; SANTOS, L.; ALVES, A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, n. 2, p. 138-155, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2013.04.001>.

FAA, G., V. M. NURCHI, A. RAVARINO, D. FANNI, S. NEMOLATO, C.GEROSA, P. V. EYKEN, AND K. GEBOES. 2008. Zinc in gastrointestinal and liver disease. **Coord. Chem. Rev.** 252:1257–1269.

FALLAVENA, L. C. B. 2001. Lesões cutâneas em frangos de corte: Causas, diagnóstico e controle. Pages 205–216 in Proc. **Conf. APINCO 2001 Ciênc. Tecnol. Avícolas. FACTA**, Campinas, São Paulo, Brazil.

FÁVARO-TRINDADE, C. S. et al., 2002. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. Julho de 2002. **Jornal de Microencapsulação** 19(4):485-94 DOI:10.1080/02652040210140715 Pub Med.

FERNÁNDEZ-RUBIO, C., ORDÓÑEZ, C., ABAD-GONZÁLEZ, J., GARCIA-GALLEGO, A., HONRUBIA, M. P., MALLO, J. J., BALAÑA-FOUCE, R., Butyric acid-based feed additives help protect broiler chickens from *Salmonella* Enteritidis infection, **Poultry Science, Volume 88, Issue 5, 2009, Pages 943-948**, ISSN 0032-5791, <https://doi.org/10.3382/ps.2008-00484>. (<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S003257911938928X>)

GAMMOH, N. Z., AND L. RINK. 2017. Zinc in infection and inflammation. **Nutrients** **9**. ARTN 62410.3390/nu9060624.

GAUTHIER, R. Intestinal health, the key to productivity. *In*: **CONVENTION ANECA-WPDC**, 27., 2002. Anais... Puerto Vallarta. México. 2002.

GHEISAR M. M, HOSSEINDOUST A., AND KIM I. H.(2015). Evaluating the effect of microencapsulated blends of organic acids and essential oils in broiler chickens diet. **Poultry Science Association Inc.**Department of Animal Resource and Science, Dankook University, Cheonan, Choongnam, 330-714, South Korea. 2015 J. Appl. Poult. Res. 24:511–519

GUILLOTEAU P, BIERNAT M, WOLINSKI J, et al., 2002 Gut regulatory peptides and hormones of the small intestine. **In Biology of Intestine in Growing Animals**, pp. 271–324 [R Zabielski, B Gregory and B Westrom, editors].

GUILLOTEAU, P., MARTIN, L., EECKHAUT, V., DUCATELLE, R., ZABIELSKI, R., and VAN IMMERSEEL, F. 2010. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. **Nutr. Res. Rev.** 23:366–384.

GUILLOTEAU P, ZABIELSKI R, DAVID JC, ET AL., 2009. Sodiumbutyrate as a growth promoter in milk replacer formula for young calves. **J Dairy Sci** 92, 1038–1049.

GROOM, M. J., GERTIE, J. (2017). "Ecology: **The Science of Ecosystems.**" Oxford University Press.

HOLD GL, PRYDE SE, RUSSELL VJ, ET AL. 2002. Assessment of microbial diversity in human colonic samples by 16S rDNA sequence analysis. **FEMS Microbiol Ecol** 39, 33–39.

JAHANIAN, R., AND RASOULI, E.. 2015. Effects of dietary substitution of zinc-methionine for inorganic zinc sources on growth performance, tissue zinc accumulation and some blood parameters in broiler chicks. **J. Anim. Physiol. Anim. Nutr.** 99:50–58.

KANETI, G.; MEIR, O.; MOR, A. Controlling bacterial infections by inhibiting proton-dependent processes. **Biochimica Et Biophysica Acta.** v. 1858, n. 5, p. 995-1003, mai. 2016.

KIM G.-B., SEO Y. M. , KIM C. H. , PAIK I. K.; Effect of dietary prebiotic supplementation on the performance, intestinal microflora, and immune response of broilers *Department of Animal Science and Technology, Chung-Ang University, Ansung-Si,, Kyonggi-do, 456-756, South Korea* 2011 **Poultry Science** 90 :75–82; doi: 10.3382/ps.2010-00732

KWIECIEN, M., A. WINIARSKA-MIECZAN, A. MILCZAREK, AND R. KLEBANIUK. 2017. Biological response of broiler chickens to decreasing dietary inclusion levels of zinc glycine chelate. **Biol. Trace Elem.Res.** 175:204–213.

LEHNINGER, A.L.; NELSON, D.A.; COX, M.M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger (1975):** 6a. Edição, 2014, ISBN 9781429234146

LEIGH, R.J.; CORRIGAN, A.; MURPHY, R.A.; WALSH, F. Effect of supplementation of the mannan-rich fraction on the commercial microbiota of broilers intestine and cecum, *Microbioma Animal* 2022-12-19 | **Artigo de revista** DOI: [10.1186/s42523-022-00208-6](https://doi.org/10.1186/s42523-022-00208-6)

LOURENÇO, M.C., KURITZA, L.N., HAYASHI, R.M., MIGLINO, L.B., DURAU, J.F. PICKLER, L., SANTIN, E. Effect of a mannanoligosaccharide-supplemented diet on intestinal mucosa T lymphocyte populations in chickens challenged with *Salmonella Enteritidis*, **Journal of Applied Poultry Research**, Volume 24, Issue 1, 2015, Pages 15-22, ISSN 1056-6171, <https://doi.org/10.3382/japr/pfu002>.

LYONS, T. P. AND HOUGH, J. S., Flocculation of brewer's yeast, British School of Malting & Brewing, Department of Biochemistry, The University of Birmingham, **J. Inst. Brew.**, Vol. 76, 1970, received 21st April 1970.

LYONS, T. P. AND HOUGH, J. S., Further evidence for the cross-bridging hypothesis of flocculation of brewer's yeast, British School of Malting and Brewing, Department of Biochemistry, The University of Birmingham, **J. Inst. Brew.**, Vol. 77, 1971, Received 21th November, 1970

MASSCHELEIN, C. A., JEUNECHOMME-RAMOS. C, **this Journal**, 1963. 332.

MENEZES, R.C., BARIN, S.J., CHICOSKI, J.A., ZEPKAI, Q.L., LOPES.J., FRIES, M. L.L., TERRA, M.N., Microencapsulation of probiotics: progress and prospects. **Ciência Rural, Santa Maria**, v.43, n.7, p.1309-1316, jul, 2013.

- NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 182-186, 2012. [http:// dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.001](http://dx.doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.001). PMID:22024623
- NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: a review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 469-479, 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.035>.
- NUNES, G. L.; SILVA, T. M.; HOLKEM, A. T.; SCHLEY, V.; MENEZES, C. R. Microencapsulação de culturas probióticas: princípios do método de spray drying. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 132-141, 2015. <http://dx.doi.org/10.5902/2179460X19742>.
- OTEIZA, P. I. 2012. Zinc and the modulation of redox homeostasis. **Free Radic. Biol. Med.** 53:1748–1759.
- PASIN, B. L.; AZÓN, C. G.; GARRIGA, A. M. Microencapsulación con alginato en alimentos: técnicas y aplicaciones. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 3, p. 130-151, 2012.
- PELCZAR, M. J., et al.; Estrutura das células procarióticas e eucarióticas. In: Microbiologia - conceitos e aplicações. V. 1, 2ª ed, c. 4, p100-43, São Paulo, **Makron Books**, 1996
- PENDER SL, QUINN JJ, SANDERSON IR, ET AL. (2000) Butyrate upregulates stromelysin-1 production by intestinal mesenchymal cells. **Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol** 279, G918–G924.
- PEREIRA, K. C.; FERREIRA, D.C.M; ALVARENGA, G.F.A.; PEREIRA, M.S.S.; BARCELOS, M.C.S.; GOMES DA COSTA, J.M.; Microencapsulation and release controlled by the diffusion of food ingredients produced by spray drying: a review. **Braz. J. Food Technol.**, v. 21, e2017083, 2018.
- PERKINS, H.R.; ROGERS, H. F. **Cell Walls and Membranes**. London: E.&F. SPON LTD, p. 135-144, 1968.
- PESSANHA. R.P., GONTIJO FILHO P.P. Uso de antimicrobianos como promotores de crescimento e resistência em isolados de Escherichia coli e de Enterobacteriaceae lactose-negativa da microflora fecal de frangos de corte. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** 53 (1) • Fev 2001 • <https://doi.org/10.1590/S0102-09352001000100018>
- RANALDI, G., S. FERRUZZA, R. CANALI, G. LEONI, P. D. ZALEWSKI, Y. SAMBUY, G. PEROZZI, AND C. MURGIA. 2013. Intracellular zinc is required for intestinal cell survival signals triggered by the inflammatory cytokine TNF alpha. **J. Nutr. Biochem.** 24: 967–976.
- RAY, S.; RAYCHAUDHURI, U.; CHAKRABORTY, R. An overview of encapsulation olfactive compounds used in food products by drying technology. **Food Bioscience**, v. 13, p. 76-83, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2015.12.009>.
- REGITANO, J. B & LEAL, R. M. P.; Comportamento E Impacto Ambiental de Antibióticos Usados na Produção Animal Brasileira, **R. Bras. Ci. Solo**, 34:601-616, 2010
- ROSSI P.; RUTZ, F.; ANCIUTI, M. A. et al. Influence of graded levels of organic zinc growth performance and carcass traits of broilers. **Journal Applied Poultry Research** 16. n 2. p. 219-225, 2007.
- RYAN, K.J. **Medical Microbiology**, 5th Edition, 2011: www.accessmedicine.com

- SHAO, Y. X., Z. LEI, J. M. YUAN, Y. YANG, Y. M. GUO, AND B. K. ZHANG. 2014. Effect of zinc on growth performance, gut morphometry, and cecal microbial community in broilers challenged with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. **J. Microbiol.** 52:1002– 1011.
- SHASHIDHARA RG, DEVEGOWDA G. Effect of dietary mannan oligosaccharide on broiler breeder production traits and immunity. **Poult Sci.** 2003 Aug;82(8):1319-25. doi:
- SAKATA T. Stimulatory effect of short-chain fatty acids on epithelial cell proliferation in the rat intestine: a possible explanation for trophic effects of fermentable fibre, gut microbes and luminal trophic factors. **Br J Nutr.** 1987 Jul;58(1):95-103. doi: 10.1079/bjn19870073. PMID: 3620440.
- SANTIN, E.; MAIORKA, A.; MACARI, M. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **J. Appl. Poult. Res.**, v.10, p.236-244, 2001.
- SAVAGE, T.F.; COTTER, P.F.; ZAKRZEWSKA, E.I. The effects of feeding mannan oligosaccharide on Immunoglobulins, plasma IgG and bile IgA, of wrolstad MW male turkeys. **Poultry Sci, Champaign, v.75, supp.1, p.143**, 1996.
- SILVA, L.E., GOTARDI, C.P., VIZZOTTO, R., KICH, J.D., CARDOSO, M.R.I., Infecção por *Salmonella enterica* em suínos criados em um sistema integrado de produção do sul do Brasil **Med. Vet. Zootec.**, vol.58, n.4., p.455-461, 2006, Faculdade de Veterinária – UFRGS, Embrapa Suínos e Aves - Concórdia, SC.
- STARK P.L., & LEE A. (1982) The bacterial colonization of the large bowel of pre-term low birth weight neonates. **J Hyg (Lond)** 89, 59–67.
- STRATFORD, M.; **Yeast.** 1994, 10, 1741.
- SUN C.Q., O'CONNOR C.J., TURNER S.J., LEWIS G. D., STANLEY R. A., ROBERTON A. M. The effect of pH on the inhibition of bacterial growth by physiological concentrations of butyric acid: Implications for neonates fed on suckled milk. Department of Chemistry, The University of Auckland, **Chemico-Biological Interactions** 113 (1998) 117–131
- SUTHERLAND, I. W.; *Tibtech January* 1998, 16, 41.
- TARCHER, B.C.; GLAUBER, J.G.; MADARAS, J.G. Zinc absorption and its relationship to intestinal metallothionein. **Journal of Nutrition**, v.110, p.1391-1397, 1980.
- THIELE-BRUHN S., 2003; Pharmaceutical antibiotic compounds in soils – a review, First published: 22 April 2003; <https://doi.org/10.1002/jpln.200390023>.
- WASMUHT, I. “Insights into a systematic analysis of novel brewhouse worts in comparison to conventional lauter tun worts.” **BrewingScience**, 2024.
- WRIGHT, G. D. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. **Chemical Communications.** v. 47, n. 14, p. 4055-61, abr. 2011.