

**UNIVERSIDADE DO ESTADO DE SANTA CATARINA – UDESC
CENTRO DE CIÊNCIAS AGROVETERINÁRIAS – CAV
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL**

MYRIAN CARLA GRANEMANN

**USO DE ÁCIDO BENZOICO BLEND ÓLEOS ESSENCIAIS E ENZIMA
MURAMIDASE NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR
*CLOSTRIDIUM PERFRINGENS***

**LAGES
2023**

MYRIAN CARLA GRANEMANN

**USO DE ÁCIDO BENZOICO BLEND ÓLEOS ESSENCIAIS E ENZIMA MURAMIDASE
NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR *CLOSTRIDIUM
PERFRINGENS***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito obtenção do título de doutora em Ciência Animal.

Orientador: Prof. Dr. Clóvis Eliseu Gewehr

**LAGES
2023**

MYRIAN CARLA GRANEMANN

**USO DE ÁCIDO BENZOICO BLEND ÓLEOS ESSENCIAIS E ENZIMA MURAMIDASE
NA DIETA DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR *CLOSTRIDIUM
PERFRINGENS***

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, da Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), como requisito obtenção do título de doutora em Ciência Animal.

BANCA EXAMINADORA

Profº Dr. Clóvis Eliseu Gewehr
Universidade do Estado de Santa Catarina

Membros:

Profª Dra. Aline Felix Schneider Bedin
Universidade Federal de Santa Catarina

Profª Dra. Franciele Zimmermann
Universidade Federal de Santa Catarina

Profº Dr. Marcos Café
Universidade Federal de Goiás

Dra. Priscila Diniz Lopes
Vaxxinova Brasil

Lages, 30 de outubro de 2023.

Aos meus pais, Enezita e Vanderlei. À minha irmã Lilian, meu cunhado Eder, meus sobrinhos Camila e Lucas. Ao meu primo e padrinho Fernando e aos meus amigos Loriana, Emanuelle, Ana Flávia, Felipe e Daniel. “ESSA CONQUISTA É NOSSA”.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer a Deus pela vida, todas as conquistas e bênçãos recebidas, por ter me ensinado a ser tolerante, perseverante, mesmo em momentos difíceis.

Aos meus pais Enezita e Vanderlei, dedico todo o meu amor e minha eterna gratidão. As minhas vitórias e conquistas são de vocês também. Ensinaram-me tudo sobre o amor, carinho, dignidade, respeito, amor ao próximo, perseverança. Mesmo estando distantes fisicamente, estavam ao meu lado, guiando meus passos, apoiando-me e incentivando-me, abdicando de suas vidas, nunca medindo esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Vocês são meus exemplos de pessoas, pais e humanos, meus melhores amigos, muito obrigada por serem os melhores pais. "Mãe, vencemos mais uma"

À minha irmã Liliann, minha amiga, minha mãe, meu exemplo de mulher, profissional, sempre ao meu lado quando eu pensava em desistir dos meus sonhos, por todo amor, carinho e abdicação para eu alcançasse meus objetivos.

Aos meus sobrinhos Camila e Lucas, meu cunhado Eder, meu primo e padrinho Fernando, por todo amor, carinho, dedicação e amizade.

À minha avó Izarina e a minha madrinha Eunice, que do céu são as minhas estrelas mais brilhantes.

À minha amiga e irmã do coração Loriana e toda a sua família, que foram minha fortaleza, a minha família e meu apoio para que eu conseguisse executar todo o meu experimento e não desistisse dos meus sonhos.

Aos meus amigos Emanuelle, Felipe, Ana Flávia e Marisa, sem a ajuda de vocês, nada disso seria possível. Obrigada por caminharem e sonharem os meus sonhos comigo.

Ao meu amigo e eterno chefe Daniel que sempre me apoiou nos meus estudos, ajudou-me na execução do experimento e vibrou pelas minhas conquistas. Muito obrigada, chefe.

À minha amiga e irmã do coração Raquel, que sempre esteve ao meu lado mesmo distante, incentivando os meus sonhos e me apoiando em todos os momentos.

À Rubia, Jairo e família por toda ajuda, colaboração, auxílio, cuidado e respeito comigo e com os animais.

À Seara Alimentos e toda a equipe corporativa, em especial Carlos, Tais, Mariana e o Laboratório de Saúde Animal, que sempre me apoiaram no desenvolvimento técnico e execução deste trabalho.

Ao colega Ivanio por toda a ajuda na execução do experimento.

À DSM, em especial ao Vitor pelo apoio no desenvolvimento técnico do experimento, pela doação de materiais e por sempre que necessário tirar às dúvidas e sugerir melhorias técnicas para a execução do trabalho.

Ao meu orientador Clóvis, pela oportunidade de realizar o doutorado e pelo conhecimento compartilhado, amizade, apoio, ajuda e orientação.

À professora Aline, que desde a graduação esteve ao meu lado, acreditou em mim e nos meus sonhos, me auxiliou no caminho profissional e agora nesta fase do doutorado foi minha mestra, amiga e sem você, nada disto seria possível.

À Universidade do Estado de Santa Catarina (UDESC), especialmente ao Centro de Ciências Agroveterinárias CAV, Lages/SC, que desde a graduação foi inteiramente importante para o meu desenvolvimento pessoal e profissional, hoje agradeço pela oportunidade de realizar o curso de pós-graduação. Orgulho de ser "caviana".

Agradeço aos colegas e a todos que de alguma forma direta ou indiretamente tiveram participação nesta caminhada.

Meu muito obrigada a todos os citados, agradeço imensamente e dedico os resultados deste trabalho.

RESUMO

Objetivou-se avaliar o uso dos aditivos ácido benzoico blend óleos essenciais e enzima muramidase em dietas de frangos de corte desafiados por *Clostridium perfringens* e relação ao ganho de peso das aves, alterações microscópicas intestinais e morfometria das vilosidades e criptas intestinais. Para o experimento *in vivo*, foram utilizados 384 pintinhos de um dia, machos, distribuídos em 24 metabólicas (1,0 X 0,5 m). As aves foram distribuídas em cinco tratamentos, sendo: Controle negativo (CN) no qual as aves receberam uma dieta basal sem a inclusão de aditivos e não desafiadas; Controle positivo (CP), onde as aves receberam dieta basal sem aditivos e desafiadas por *Clostridium perfringens*; o terceiro tratamento (CPA) as aves que receberam dieta basal, com a adição de 300 g/tonelada do ácido benzoico blend óleos essenciais e desafiadas por *Clostridium perfringens*; o quarto tratamento (CPM) recebeu dieta basal com a adição de 350 g/tonelada da enzima muramidase e desafiadas por *Clostridium perfringens*; e o último tratamento (CPA+CPM) que recebeu dieta basal, com a adição de 300 g/tonelada do ácido benzoico blend óleos essenciais e 350 g/tonelada da enzima muramidase e desafiadas por *Clostridium perfringens*. As aves dos tratamentos CP, CPA, CPM e CPA+CPM foram desafiadas aos 5 dias de idade com 3 mL de um inóculo na concentração final de $3,4 \times 10^7$ UFC/ml, isolado de campo, pela via oral. Foram necropsiadas duas (2) aves de cada tratamento no 8º, 10º, 15º, 20º, 30º e 38º dia de vida das aves. Realizou-se coletas e pesagens dos órgãos, em balança digital, das porções dos segmentos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e ceco) e fígado. Observou-se através dos resultados que o ácido benzoico blend óleos essências e a enzima muramidase influenciaram positivamente sobre o peso médio das aves aos 21 dias e sobre o ganho de peso médio diários das aves entre 14-21 dias, nas quais foram desafiadas por *Clostridium perfringens*. Na porção do jejuno, a enzima muramidase influenciou positivamente sobre a diferenciação da mucosa intestinal e um maior ganho de peso médio vivo e ganho de peso médio diário entre 35 e 38.

Palavra-chave: Aditivos; Ganho de peso, Microscopia, Morfometria intestinal.

ABSTRACT

The objective was to evaluate the use of benzoic acid blend essential oils and muramidase enzyme in diets of broiler chickens challenged by *Clostridium perfringens* on zootechnical performance, intestinal microscopic changes and morphometry of intestinal villi and crypts. For the in vivo experiment, 384 one-day-old male chicks were used, distributed in 24 cages (1.0 x 0.5 m). The birds were distributed into five treatments, as follows: Negative control (CN) in which the birds received a basal diet without the inclusion of additives and were not challenged; Positive control (CP), where birds received a basal diet without additives and challenged of *Clostridium perfringens*; the third treatment (CPA) included birds that received a basal diet, with the addition of 300 g/ton of benzoic acid blend essential oils and challenged of *Clostridium perfringens*; the fourth treatment (CPM) received a basal diet with the addition of 350 g/ton of the muramidase enzyme and challenged of *Clostridium perfringens*; and the last treatment (CPA+CPM) which received a basal diet, with the addition of 300 g/ton of benzoic acid blend essential oils and 350 g/ton of the enzyme muramidase and challenged of *Clostridium perfringens*. Birds of the treatments CP, CPA, CPM and CPA+CPM were challenged at 5 days of age with 3 mL of an inoculum at a final concentration of 3.4×10^7 CFU/ml, isolated from the field, orally. Two (2) birds from each treatment were necropsied on the 8, 10, 15, 20, 30 and 38 day of the birds' lives. Organs were collected and weighed on a digital scale, portions of the intestinal segments (duodenum, jejunum, ileum and cecum) and liver. It was observed through the results that the benzoic acid blend essential oils and the enzyme muramidase positively influenced the average weight of the birds at 21 days and on the average daily weight gain of the birds between 14-21 days, in which they were challenged by *Clostridium perfringens*. In the jejunum portion, the enzyme muramidase positively influenced the differentiation of the intestinal mucosa and a higher average live weight gain and average daily weight gain between 35 and 38 of the birds' lives.

Keywords: Additives; Weight gain, Microscopy, Intestinal morphometry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Aves distribuídas em gaiolas metabólicas, com bebedouros tipo nipple, um reservatório acoplado e comedouros tipo calha	44
Figura 2 - Colônias características de <i>Clostridium perfringens</i> apresentando coloração negra, com tamanho variante entre 1 a 3 mm, em placas contendo meio de SPS	45
Figura 3 - Inóculo de <i>Clostridium perfringens</i> na concentração final de $3,4 \times 10^7$ UFC/ml, de acordo com a escala de Mac Farland	46
Figura 4 - Inóculo de <i>Clostridium perfringens</i> administrado, por via oral, com auxílio de pipeta, introduzida até o papo das aves	47
Figura 5 - Histomorfometria do intestino com a mensuração de 5 vilosidades por seção de cada segmento, da altura (μm) e profundidade da cripta (μm).....	50
Gráfico 1 - Fator de severidade duodeno aos (8, 10, 15, 20, 30 e 38 dias)	57
Gráfico 2 - Fator de severidade jejuno aos (8, 10, 15, 20, 30 e 38 dias)	58
Gráfico 3 - Fator de severidade íleo aos (8, 10, 15, 20, 30 e 38 dias).....	59
Gráfico 4 - Fator de severidade ceco aos (8, 10, 15, 20, 30 e 38 dias)	60
Figura 6 - Microplaca de diluição e seus respectivos poços com replicata das amostras, controle do inóculo, controle do meio e controle do ácido benzoico associado a óleos essenciais.....	76
Figura 7 - Microplaca de diluição e seus respectivos poços com replicata das amostras, controle do inóculo, controle do meio e controle da enzima muramidase	77
Figura 8 - Teste de sensibilidade antimicrobiana pela técnica de difusão em disco	79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Esquema de toxinotipagem do <i>Clostridium perfringens</i>	21
Tabela 2 - Composição percentual das rações experimentais isonutritivas	43
Tabela 3 - Critérios histológicos utilizados para determinar o escore de lesões intestinais	49
Tabela 4 - Peso médio vivo das aves aos 7, 14, 21, 28, 35 e 38 dias.....	51
Tabela 5 - Ganho de peso diário (GPD) de frangos de corte	51
Tabela 6 - Peso relativo dos órgãos de frangos de corte com 8 dias de idade	53
Tabela 7- Peso relativo dos órgãos de frangos de corte com 10 dias de idade	54
Tabela 8 - Peso relativo dos órgãos de frangos de corte com 15 dias de idade	54
Tabela 9 - Peso relativo dos órgãos de frangos de corte com 20 dias de idade	55
Tabela 10 - Peso relativo dos órgãos de frangos de corte com 30 dias de idade	56
Tabela 11 - Morfometria do duodeno da cripta e altura do vilo em mm (média ± desvio padrão).....	61
Tabela 12 - Morfometria do jejuno da cripta e altura do vilo em mm (média ± desvio padrão).....	61
Tabela 13 - Morfometria do íleo da cripta e altura do vilo em mm (média ± desvio padrão).....	62
Tabela 14 - Oligonucleotídeos iniciadores (primers), utilizados para a detecção dos genes que codificam as toxinas e os fatores de virulência adicionais na cepa isolada de campo de.....	73
Tabela 15 - Sensibilidade e resistência da estirpe de <i>Clostridium perfringens</i> frente aos antimicrobianos com uso na medicina veterinária.....	79
Tabela 16 - Concentração inibitória mínima (CIM) da estirpe de <i>Clostridium perfringens</i>	80

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	16
2.1	ÁCIDOS ORGÂNICOS.....	16
2.2	ÁCIDO BENZOICO	18
2.3	ÓLEOS ESSENCIAIS	18
2.4	MURAMIDASE	19
2.5	<i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS.....</i>	20
2.6	HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DO INTESTINO DAS AVES.....	22
3	HIPÓTESES.....	25
3.1	HIPÓTESE GERAL	25
3.2	HIPÓTESE ESPECÍFICA.....	25
4	OBJETIVOS.....	26
4.1	OBJETIVO GERAL	26
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
	REFERÊNCIAS	27
5	ÁCIDO BENZOICO ASSOCIADO A ÓLEOS ESSENCIAIS E ENZIMA MURAMIDASE SOBRE O DESEMPENHO ZOOTÉCNICO DE FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i>.....	36
5.1	RESUMO	36
5.2	ABSTRACT	38
5.3	INTRODUÇÃO	40
5.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	42
5.5	INOCULAÇÃO DAS AVES.....	45
5.6	AVALIAÇÕES	47
5.6.1	Peso médio vivo	47
5.6.2	Ganho de peso médio diário.....	48
5.6.3	Peso relativo dos órgãos e histomorfometria intestinal	48
5.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	50
5.8	RESULTADOS E DISCUSSÃO	50

5.9	CONCLUSÃO	63
	REFERÊNCIAS	64
6	AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>CLOSTRIDIUM PERFRINGENS</i> FRENTE AOS ADITIVOS ÁCIDO BENZOICO ASSOCIADO A ÓLEOS ESSENCIAIS E ENZIMA MURAMIDASE	68
6.1	RESUMO	68
6.2	ABSTRACT	70
6.3	INTRODUÇÃO	72
6.4	MATERIAL E MÉTODOS.....	73
6.4.1	Detecção dos genes que codificam as toxinas e os fatores de virulência da cepa isolada de campo de <i>Clostridium perfringens</i>.....	73
6.4.2	Avaliar o perfil de sensibilidade da estirpe de <i>Clostridium perfringens</i> frente aos antimicrobianos.....	74
6.4.2.1	<i>Antibiograma.....</i>	74
6.4.3	Concentração Inibitória mínima (CIM) do ácido benzoico associado a óleos essenciais frente a cepa de <i>Clostridium perfringens</i>.....	75
6.4.4	Concentração Inibitória Mínima (CIM) da enzima muramidase frente a cepa de <i>Clostridium perfringens</i>	76
6.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
6.6	CONCLUSÃO	82
	REFERÊNCIAS	83

1 INTRODUÇÃO

O Brasil é o terceiro maior produtor de carne de frango, produzindo no ano de 2022 mais de 14 milhões de toneladas, ficando atrás apenas dos Estados Unidos e da China do total da produção mundial (ABPA, 2023). Da produção brasileira, 33,2 % é destinada à exportação, fazendo com que o Brasil seja o maior exportador de carne de frango do mundo. Santa Catarina é o segundo maior produtor de frangos do Brasil, possuindo aproximadamente 6.000 produtores dedicados a criação de aves de corte, os quais estão concentrados nas regiões meio-oeste e oeste (Governo de Santa Catarina, 2023), demonstrando a importância da avicultura de corte para a economia de Santa Catarina.

Para que os índices de produtividade e qualidade sejam alcançados, a avicultura deve estar baseada em alguns pilares fundamentais, como o melhoramento genético, a nutrição, a sanidade e o manejo dos lotes, os quais se em equilíbrio, resultam em resultados satisfatórios de produção (Fascina, 2011).

Os altos índices de produtividade das aves e uma conversão alimentar eficiente são necessidades da moderna indústria avícola. Todavia, o aumento da digestibilidade e absorção de nutrientes pode ser alcançada pelo uso de aditivos específicos. Os antibióticos promotores de crescimento (APCs) utilizados em larga escala na alimentação das aves, estabilizam a microbiota intestinal e melhoraram o desempenho geral do animal, evitando assim, patologias intestinais específicas (Hassan *et al.*, 2010).

Durante décadas, o uso de antibióticos promotores de crescimento (APCs) em dietas de frangos, teve como resultado uma alta performance das aves e como consequência da alta lucratividade. Entretanto, a possibilidade de promover resistência bacteriana ocasionada pelo contínuo uso de APCs, são de interesse em saúde pública e em saúde animal e a busca alternativas tem sido cada vez mais estudada. A restrição do uso de APCs contribui para elevada prevalência de doenças, como a enterite necrótica (EN) causada por *Clostridium perfringens*, bactéria gram-positiva (Pereira *et al.*, 2015).

Como alternativa aos APCs um grande número de aditivos alimentares como prebióticos, probióticos, fitobióticos, óleos essenciais, enzimas e ácidos orgânicos são utilizados nas dietas avícolas, objetivando aumentar a digestibilidade dos nutrientes e

melhorar o status microbiano intestinal (Wenk, 2003), ocasionando melhora no desempenho zootécnico das aves (Thompson *et al.*, 1997).

Assim, o objetivo desta tese é avaliar o uso de aditivos na dieta de frangos de corte desafiados por *Clostridium perfringens* sobre o desempenho zootécnico, alterações microscópicas e histomorfométricas intestinais e potencial antimicrobiano.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ÁCIDOS ORGÂNICOS

Os ácidos orgânicos, também denominados de ácidos carboxílicos, contém uma ou mais carboxilas em sua molécula, apresentado em sua estrutura geral como (R-COOH), classificação na qual podem ser incluídos os ácidos graxos e aminoácidos, os quais são comumente encontrados na natureza, como componentes de tecidos vegetais e animais. Uma gama de ácidos orgânicos, com propriedades químicas e físicas variadas, pode ser utilizados para animais, como suplementos via água ou aditivos alimentares (Khan; Lqbal, 2016).

Os ácidos orgânicos de cadeia curta (C1-C7), estão associados à atividades antimicrobianas e dissociam-se com um pKa entre 3 e 5, dentre eles podemos citar: os ácidos monocarboxílicos simples, como os ácidos fórmico, acético, propiônico e butírico, ou ácidos carboxílicos com o grupo hidroxila, como o ácido lático, málico, tartárico e cítrico ou ainda os ácidos carboxílicos de cadeia curta contendo ligações duplas, como os ácidos fumárico e sórbico (Saleem, *et al.*, 2020; Shadini; Maziar; Delaram, 2014; Cherrington *et al.*, 1991), podendo ser utilizados nas formas individuais ou associados a outros sais. Quando são utilizados na forma de sais, são fáceis de manusear, devido à sua forma menos volátil e incorporam-se com maior facilidade às rações (Huyghebaert; Ducatelle; Van Immerseel, 2011).

De acordo com estudos em aves, a inclusão de ácidos orgânicos nas dietas de frangos, melhoram a digestibilidade dos nutrientes, aumentam a população de (*Lactobacillus spp.*) intestinais, reduzem a multiplicação de bactérias nocivas que comumente afetam a saúde intestinal, como (*Salmonella*, *Campylobacter*, *Escherichia coli* e *Clostridiun perfringens* (Dai *et al.*, 2021; Pereira *et al.*, 2015; Abudabos *et al.*, 2014; Naseri *et al.*, 2012), melhorando as respostas imunes intestinais e também às funções e integridade da mucosa (Pham *et al.*, 2020). Bactérias gram-positivas são mais sensíveis aos ácidos orgânicos, do que bactérias gram-negativas (Dibner; Buttin, 2002).

Ácidos orgânicos, caracterizam-se como ácidos fracos, pois não se dissociam completamente quando dissolvidos em água, ou seja, não estão completamente

ionizados. Quanto mais forte for o ácido, maior a capacidade de doar prótons para o meio. As constantes de dissociação dos ácidos podem ser representadas pelo potencial de dissociação, o pka. O pka é o logaritmo negativo da constante de dissociação e representa o pH em que metade da substância se encontra na forma dissociada (Lehninger *et al.*, 1995).

A atividade antimicrobiana dos ácidos orgânicos está relacionada com a redução do pH no trato gastrointestinal e pela capacidade destes, de atravessar a membrana celular do patógeno, dissociando-se e acidificando o citoplasma. À exportação excessiva de prótons pela tentativa das bactérias em manter o pH intracelular, resulta em uma diminuição da energia celular, podendo levar o micro-organismo à morte (Cruz-Polycarpo *et al.*, 2020; Van Immerseel *et al.*, 2006). Além da atividade antimicrobiana, os ácidos orgânicos possuem outras atividades biológicas, como melhorar a saúde intestinal e aumentar a absorção intestinal dos nutrientes (Saleem *et al.*, 2020).

A eficácia dos ácidos orgânicos é influenciada por diversos fatores, dentre eles o pH intestinal, a dosagem utilizada, composição química do ácido, capacidade tampão dos ingredientes utilizados, heterogeneidade da microbiota intestinal, resistência inerente dos micro-organismos, espécie de animal testada e as condições de biosseguridade do ambiente de produção (Cruz-Polycarpo *et al.*, 2020; Dibner; Buttin, 2002; Chaveerach *et al.*, 2002; Thompson; Hinton, 1997).

Os pka dos ácidos orgânicos apresentam variações nas dissociações, aos longos dos diferentes níveis de pH do trato gastrointestinal (Viola; Vieira, 2007), visto que as medidas do pH dos segmentos intestinais das aves variam de 6,4 no duodeno, 6,6 o jejuno e 7,2 no íleo (Sturkie, 1986). Uma das grandes restrições ao uso de ácidos orgânicos nas dietas, é o metabolismo rápido dos seus componentes e às altas taxas de absorção nas partes proximais do trato gastrointestinal, resultando em baixas concentrações nas partes distais (Yousaf *et al.*, 2017).

Embora o benefício mais notável do uso de ácidos orgânicos, em dietas de frangos de corte, seja diminuir o pH do trato gastrointestinal, os ácidos orgânicos podem diminuir a capacidade de invasão dos patógenos à célula intestinal e ainda interferir em funções particulares do metabolismo celular das bactérias, como replicação e síntese de proteínas (Ricke, 2003; Russel, 1992).

2.2 ÁCIDO BENZOICO

O ácido benzóico (C_6H_5COOH) é uma substância sólida cristalina e incolor. Conhecido há mais de 100 anos pela capacidade de inibição do crescimento de fungos, por seu princípio ativo denominado benzoato. Hoje, amplamente utilizado em concentrações que variam entre de 5 a 10 mM para a preservação de ácidos em alimentos, como suco de frutas, picles, vinhos e na indústria farmacêutica (Jozefiak *et al.*, 2007). A adição de ácido benzoico nas dietas alimentares, reduz o pH da digesta, acelera a conversão do pepsinogênio em pepsina e diminui a formação de complexos insolúveis mineral-fitato, tendo como consequência a melhora na taxa de absorção de proteínas, aminoácidos e minerais (Sohail *et al.*, 2015; Emami; Naeini; Ruiz-Feria, 2013). Amaechi e Anueyagu (2012) relataram que a inclusão de 1,2 % de ácido benzoico em dietas de frangos de corte, melhoraram o desempenho e a saúde intestinal dos animais, entretanto, Józefiak *et al.* (2007), afirmaram que dosagens de ácido benzoico em dietas de frangos de corte, superior a 0,25% causaram diminuição no crescimento das aves e piora na conversão alimentar.

Segundo Friedman, Henika e Mandrell (2003), estudos relatam que o ácido benzoico desempenha um importante controle de bactérias como o *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* e *Salmonella enterica*.

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis, com baixa toxicidade, produzidos por organismos vivos e isolados apenas por meios físicos (prensagem e destilação) de uma planta inteira ou parte dela (Adewole; Oladokun; Santin, 2021; Zhai *et al.*, 2018). Possuem odor característico e são solúveis em solventes. A maioria dos óleos são mais leves que a água, com uma gravidade específica entre 0,8 e 1,17 (Krishan; Narang, 2014). Os princípios ativos dos óleos essenciais são os glicosídeos, alcalóides, compostos fenólicos e polifenólicos (quinonas, flavonas, taninos e cumarinas), terpenóides (mono e sesquiterpenos), saponinas, micilagens, flavonóides, compostos sulfidrílicos e elementos químicos específicos (Simões *et al.*, 2017). Além disso, os óleos essenciais possuem propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias,

imunomoduladoras, antiparasitárias e estimuladores de secreção de enzimas digestivas, processo que resulta em melhorias no desempenho e sanidade das aves. A adição de óleos essenciais, em substituição ao uso de antibióticos promotores de crescimento nas dietas de frangos de corte, tem-se dado devido às propriedades antimicrobianas dos mesmos, os quais possuem efeitos positivos sobre a colonização e multiplicação de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal das aves, melhorando a digestibilidade dos nutrientes e desempenho zootécnico dos animais (Krishan; Narang, 2014; Amerah *et al.*, 2011). Estudos em aves, demonstram que a inclusão de óleos essenciais, em dieta de frangos, pode diminuir a colonização da microbiota intestinal por salmonelas patogênicas (Alali *et al.*, 2013), *Escherichia coli* (Liu *et al.*, 2018), *Clostridium Perfringens* (Yin *et al.*, 2017; Du *et al.*, 2015) e *Eimeria* spp (Upadhyaya *et al.*, 2019; Bozkurt *et al.*, 2016).

O principal modo de ação do efeito sinérgico da utilização da associação de ácidos orgânicos e óleos essenciais é a modulação da microbiota intestinal, a qual afeta diretamente a saúde intestinal dos animais e melhora o desempenho zootécnico (Stefanello *et al.*, 2020; Liu, *et al.*, 2017; Brul *et al.*, 1999). A propriedade hidrofóbica dos óleos essenciais aumenta a permeabilidade da membrana bacteriana, o que facilita o influxo de ácidos orgânicos para o interior do citoplasma, reduzindo o pH interno e prejudicando o metabolismo das bactérias (Smyth *et al.*, 2018), podendo levar à morte das bactérias.

2.4 MURAMIDASE

Os peptideoglicanos (PPGs) são componentes estruturais da parede celular bacteriana, com funções de garantir a integridade celular e servir como ponto de ancoragem para componentes do envelope celular, como proteínas e ácidos teicoicos (Vollmer *et al.*, 2008). Durante o crescimento das bactérias, há um processo natural de reciclagem da parede celular bacteriana, afim de recuperar os constituintes liberados pelo transporte ativo. O acúmulo de PPGs no lúmen intestinal possui ação pró-inflamatória para o hospedeiro, podendo prejudicar a digestão e absorção dos nutrientes e diminuição do desempenho zootécnico do animal (Wheeler *et al.*, 2014; Mayer *et al.*, 2012). As muramidases (EC 3.2.1.17), também conhecidas como lisozimas ou N-acetilmuramidases (EC 3.2.1.17) pertencem à família das enzimas glicosil hidrolíticas,

encontradas em uma grande variedade de secreções animais, plantas e micro-organismos constituem uma categoria de enzimas diferente das xilanases clássicas, proteases e fitases que são frequentemente utilizadas nas dietas de frango de corte. Sua principal função é clivar as ligações β -1,4 glicocosídicas entre o ácido N-acetilmurâmico e N-acetilglucosamina na cadeia principal dos carboidratos peptideoglicanos (PGGs) (Pirgozliev *et al.*, 2021; Goodarzi Boroojeni *et al.*, 2019; Lichtenberg *et al.* 2017). O uso da muramidase microbiana, hidrolizante de peptideoglicanos de *Acremonium alcalophilum*, expresso em *Trichoderma reesei*, em dietas de frangos de corte, foi relatado como efeito positivo sobre o ganho de peso das aves, diminuição da conversão alimentar, sem que houvesse a redução da microflora intestinal de enterobactérias e *Lactobacillus* (Goodarzi Boroojeni *et al.*, 2019; Sais *et al.*, 2019; Lichtenberg *et al.*, 2017). Estudos demonstram que a suplementação de lisozima de clara de ovo em dieta de aves, pode promover a melhora da saúde intestinal e aumentar o desempenho dos animais (Abdel-Latif *et al.*, 2017; Liu, D. *et al.* 2010), além de impedir a colonização de patógenos e do desenvolvimento de doenças, como a enterite necrótica, causada pelo *Clostridium perfringens* em frangos de corte (Liu, D. *et al.*, 2010).

2.5 CLOSTRIDIUM PERFRINGENS

O intestino das aves é habitualmente colonizado por micro-organismos comensais, simbióticos benéficos e patogênicos. Dentre eles podemos citar às bactérias facultativas e as anaeróbicas estritas, como os *Lactobacillus* *Bifidobacterium*, *Streptococcus*, *Enterococcus*, *Bacteroides*, *Clostridium* e *Escherichia* (Dubos *et al.*, 1965).

O *Clostridium perfringens*, uma bactéria anaeróbica Gram-positiva, formadora de esporos, amplamente conhecida por produzir mais de 20 toxinas extracelulares, que contribuem para a fisiopatologia de uma variedade de doenças histotóxicas e enterotóxicas, incluindo a enterite necrótica (EN) em aves. Considerado um patógeno de grande importância na cadeia avícola, o *Clostridium perfringens*, causa grandes perdas econômicas globais, por causar lesões e manifestações clínicas severas e prejudicar o desempenho zootécnico das aves (Wade; Keyburn, 2015).

Em geral, o *Clostridium perfringens* é uma bactéria comensal do intestino das aves, que não desenvolve doença em circunstâncias normais. O processo patogênico da

doença, requer fatores de indução, os quais causam desequilíbrio da microbiota intestinal, dentre os quais podemos citar: co-infecção pelo parasita *Eimeria* spp, qualidade da água, qualidade da cama, dietas ricas em proteínas, altas densidades populacionais, imunidade do hospedeiro, aumentando a multiplicação e colonização intestinal por *C.perfringens* (Oviedo-Rondón, 2019; Kiu, R. et al., 2019; Yang, W. et al., 2019; Stanley et al., 2014; Drew, M et al., 2004). As alterações gastrointestinais podem afetar as funções digestivas, absorventes, metabólicas e imunológica das aves (Svihus, 2014), promovendo continuamente o desenvolvimento da EN (Immerseel et al., 2008).

A colonização primária no trato gastrointestinal por *C.perfringens*, ocorre no ceco, devido à um maior número de bactérias presentes nessa porção intestinal, portanto, as alterações induzidas pela enterite necrótica refletem diretamente na patogenicidade causada pela doença. Além disso, sabe-se que a microbiota cecal dos frangos desempenha um papel importante na proteção e resistência a outros patógenos, incluindo o *Campylobacter jejuni*.

Uma grande quantidade de fatores de virulência contribui para a degradação dos tecidos do hospedeiro, e extração de nutrientes essenciais para a sobrevivência do *Clostridium perfringens*, o qual é capaz de produzir uma ou diversas toxinas. A variação na produção das toxinas está relacionada ao esquema de toxinotipagem, que classifica o *C.perfringens* em sete grupos (A-G), de acordo com a produção de seis dessas toxinas: toxinas alfa (CPA), beta (CPB), épsilon (ETX), iota (ITX), enterotoxina (CPE) e NetB (Gohari et al., 2021; Rood et al., 2018).

Tabela 1 - Esquema de toxinotipagem do *Clostridium perfringens*

Toxinótipo	Toxina produzida					
	CPA	CPB	ETX	ITX	CPE	NetB
A	+	-	-	-	-	-
B	+	+	+	-	-	-
C	+	+	-	-	±	-
D	+	-	+	-	±	-
E	+	-	-	+	±	-
F	+	-	-	-	+	-
G	+	-	-	-	-	+

Fonte: Gohari et al. (2021).

A enterite necrótica é causada predominantemente por *C. perfringens* tipo A e em menor grau pelo tipo C. Recentemente uma toxina secretora de β-poros segregada NetB, tem sido isolada em casos de enterite necrótica (Keyburn *et al.*, 2008; Keyburn *et al.*, 2006). NetB é codificado em um locus de patogenicidade do *Clostridium perfringens*, sendo transmitido por plasmídeo (Leep *et al.*, 2010), no qual demonstra ser essencial para o desenvolvimento da enterite necrótica (Keyburn *et al.*, 2008), embora outros fatores de virulência sejam necessários (Zhou *et al.*, 2017; Leep *et al.*, 2010). Apesar dos estudos, os fatores de virulência que levam ao aparecimento da EN ainda não são conhecidos integralmente, envolvendo a competição com a microbiota existente e a rápida proliferação de cepas do tipo G no intestino delgado das aves (Prescott *et al.*, 2016), juntamente com a produção de NetB que é regulado por um mecanismo de quorum sensing AGR (Yu *et al.*, 2017), para finalmente produzir às lesões intestinais características de enterite necrótica.

A enterite necrótica é mais comum em frangos de corte com idade entre 2 a 5 semanas de idade. A doença pode apresentar-se de duas formas distintas: a clínica e a subclínica. Na forma clínica os sinais clínicos incluem a depressão, diarreia, anorexia, decúbito esternal e um aumento repentino na mortalidade. Já a forma subclínica está associada ao baixo consumo de alimento e ganho de peso, tendo como consequência o aumento da taxa de conversão alimentar (To, H. *et al.*, 2017).

2.6 HISTOLOGIA E MORFOMETRIA DO INTESTINO DAS AVES

Nas duas primeiras semanas de vida, o trato gastrointestinal do pintinho, passa pelo processo de maturação dos processos digestivos e absorтивos, os quais podem afetar significativamente todo o desempenho produtivo ao longo do ciclo de vida da ave (Artoni, 2004). O desenvolvimento do trato gastrointestinal apresenta-se pelo tamanho do órgão, peso em comparação com outros tecidos e através do aumento do número de vilosidades e área de absorção e maturação dos enterócitos (Uni; Ganot; Skalan, 1998). O desenvolvimento inicial e a maturação do sistema digestório são de grande importância para o desenvolvimento de outros órgãos e tecidos (Moran Jr., 2007), como sistema imune (Dibner *et al.*, 1998) e muscular (Halevy *et al.*, 2000).

Os órgãos tubulares do sistema digestório das aves são constituídos por quatro túnicas concêntricas, denominadas: mucosa, submucosa, muscular e serosa, às quais apresentam características histológicas e fisiológicas distintas. A mucosa composta por epitélio que reveste internamente os órgãos por uma lâmina própria de tecido conjuntivo frouxo, e pela muscular mucosa, que é uma fina camada de músculo liso. A túnica submucosa é constituída de tecido conjuntivo moderado denso. A muscular possui duas camadas de músculo liso e a serosa que é formada de tecido conjuntivo envolto (Macari; Furlan; Gonzales., 2002).

Os vilos proporcionam um aumento na superfície interna do intestino delgado, aumentam a área de digestão e absorção intestinal. As vilosidades são revestidas por epitélio simples e são constituídas por três tipos celulares funcionalmente distintos, são eles: as células caliciformes, os enterócitos e as células enteroendócrinas. Devido às diferenças na altura dos vilos e a espessura da túnica muscular, as três regiões do intestino delgado diferem quanto à espessura de suas paredes (Macari *et al.*, 2002).

O desenvolvimento da mucosa intestinal é decorrente de dois eventos citológicos primários associados. O primeiro é a renovação celular que consiste na proliferação e diferenciação das células intestinais, resultante das divisões mitóticas sofridas pelas células totipotentes, localizadas na cripta e ao longo dos vilos. O outro evento é a perda de células por descamação, que ocorre geralmente no ápice dos vilos. O equilíbrio entre esses dois processos é determinado por uma taxa de renovação constante, chamada de “turnover celular”, influenciando na capacidade digestiva e de absorção intestinal (Pellicano, *et al.*, 2003).

As vilosidades tornam-se mais curtas e a profundidade das criptas diminui, no sentido do duodeno para o íleo, pois a mucosa torna-se mais delgada (Duke, 2006). É possível dividir as criptas em três áreas, sendo elas metade basal, meio da cripta, onde ocorre regularmente o desenvolvimento do epitélio local e por último, a zona de diferenciação e maturação das células intestinais (Hodges; Michael, 1975).

A maior altura de vilos e a relação vilo/cripta estão associadas com uma boa diferenciação da mucosa intestinal (Jeurissen *et al.*, 2002). Vilos curtos (relativo à profundidade de cripta), possuem menos células absorтивas e mais células secretórias (Scheeman; Richter; Jacobs, 1982). A relação desejável entre as vilosidades e as criptas

intestinais é quando as vilosidades se apresentam altas e as criptas rasas, pois quanto maior a relação da altura das vilosidades: profundidade de cripta, menores serão as perdas energéticas com a renovação celular e maiores serão às taxas de absorção de nutrientes (Arruda *et al.*, 2008).

O comprimento e diâmetro do intestino podem variar de acordo com o tipo de dieta, presença de aditivos alimentares ou promotores de crescimento, microbiota bacteriana e intensidade de desenvolvimento corporal na fase inicial até os 14 dias de idade das aves (Ito *et al.*, 2004).

3 HIPÓTESES

3.1 HIPÓTESE GERAL

O ácido benzoico associado a óleos essencias e enzima muramidase na dieta de frangos de corte pode substituir antibióticos promotores de crescimento e garantir o desempenho zootécnico igual ou superior ao das aves desafiadas por *Clostridium perfringens*.

3.2 HIPÓTESE ESPECÍFICA

O ácido benzoico associado a óleos essencias e enzima muramidase aumentam ganho de peso médio e o ganho de peso médio diário das aves, além de diminuir a intensidade e severidade das lesões intestinais causadas por *Clostridium perfringens*, além de possuir atividade antimicrobiana.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a adição do ácido benzoico associado a óleos essenciais e enzima muramidase em dietas de frangos de corte, desafiados por *Clostridium perfringens* sobre o desempenho zootécnico, alterações microscópicas intestinais e morfometria das vilosidades e criptas intestinais e potencial antimicrobiano.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar o ganho de peso diário das aves em diferentes idades submetidas a dietas contendo ácido benzoico associado a óleos essenciais e enzima muramidase;
- b) Avaliar o peso médio das aves em diferentes idades submetidas a dietas contendo ácido benzoico associado a óleos essenciais e enzima muramidase;
- c) Avaliar o peso relativo dos órgãos (duodeno, jejuno, íleo e fígado) aos 8, 10, 15, 20, 30 e 38 dias de idade das aves;
- d) Avaliar a intensidade e o grau de severidade das lesões intestinais, após o desafio com *Clostridium perfringens* aos 8, 10, 15, 20, 30 e 38 dias de idade das aves;
- e) Avaliar a morfometria das vilosidades e criptas intestinais no 30º dia de idade das aves;
- f) Detectar os genes que codificam as toxinas e os fatores de virulência da cepa isolada de campo de *Clostridium perfringens*;
- g) Avaliar o perfil de sensibilidade da cepa isolada de campo de *Clostridium perfringens* frente aos antimicrobianos de uso da medicina veterinária;
- h) Teste *in vitro* da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido benzoico associado a óleos essenciais e da enzima muramidase frente à cepa de *Clostridium perfringens*.

REFERÊNCIAS

ABDEL-LATIF, M. A.; EL-FAR, A. H.; ELBESTAWY, A. R.; GHANEM, R.; MOUSA, S. A.; EL-HAMID, H. S. Abd. Exogenous dietary lysozyme improves the growth performance and gut microbiota in broiler chickens targeting the antioxidant and non-specific immunity mRNA expression. **Plos One**, v. 12, n. 10, p. e0185153, Oct. 2017. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0185153>

ABPA. **Relatório anual**. São Paulo: ABPA, 2023. Disponível em: <https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2023/04/Relatorio-Anual-2023.pdf>. Acesso em: 01 maio 2023.

ABUDABOS, A. M.; AL-MUFARREJ, S. I.; ALYEMNI, ABDULLAH H.; YEHIA, H. M.; GARELNABI, A. R.; ALOTYB, M. N. Effect of using organic acids to substitute antimicrobial growth promoters on broiler chickens performance. **Journal of Food, Agriculture & Environment**, v. 12, n. 2, p. 447-451, 2014.

ADEWOLE, D. I.; OLADOKUN, S.; SANTIN, E. Effect of organic acids–essential oils blend and oat fiber combination on broiler chicken growth performance, blood parameters, and intestinal health. **Animal Nutrition**, v. 7, n. 4, p. 1039-1051, Dec. 2021. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.aninu.2021.02.001>

ALALI, W. Q.; HOFACRE, C.L.; MATHIS, G.F.; FALTYS, G.. 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, mar. 2013. DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02783>.

AMAECHI, N.; ANUEYIAGU, C.F. The effect of dietary benzoic acid supplementation on growth performance and intestinal wall morphology of broilers. **Online Journal of Animal and Feed Research**, v. 2, n. 5, p. 401–404, 2012.

AMERAH, A. M.; PÉRON, A.; ZAEFARIAN, F.; RAVINDRAN, V. Influence of whole wheat inclusion and a blend of essential oils on the performance, nutrient utilisation, digestive tract development and ileal microbiota profile of broiler chickens. **British Poultry Science**, v. 52, n. 1, p. 124-132, Feb. 2011. DOI: <http://doi.org/10.1080/00071668.2010.548791>

ARRUDA, A. M. V.; FERNANDES, R. T. V.; SILVA, J. M.; LOPES, D. C. Avaliação morfo-histológica da mucosa intestinal de coelhos alimentados com diferentes níveis e fontes de fibra. **Revista Caatinga**, Mossoró, v.21, n.2, p.1-11, abr./jun. 2008.

ARTONI, S. M. B. Anatomia do sistema digestório das aves. In: CURSO de Fisiologia da Digestão e Metabolismo de Nutrientes em Aves. Jaboticabal: UNESP, out. 2004. 1 CD-ROM.

BOZKURT, M.; EGE, G.; AYSUL, N.; AKŞIT, H.; TÜZÜN, A.e.; KÜÇÜKYILDIZ, K.; BORUM, A.e.; UYGUN, M.; AKŞIT, D.; AYPAK, S.. Effect of anticoccidial monensin with

oregano essential oil on broilers experimentally challenged with mixed *Eimeria* spp. **Poultry Science**, v. 95, n. 8, p. 1858-1868, Aug. 2016.
<http://doi.org/10.3382/ps/pew077>

BRUL, S. Preservative agents in foods Mode of action and microbial resistance mechanisms. **International Journal Of Food Microbiology**, v. 50, n. 1-2, p. 1-17, 15 Sep. 1999. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605\(99\)00072-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0168-1605(99)00072-0)

CHAVEERACH, P; KEUZENKAMP, D.A.; URLINGS, H.A.; LIPMAN, L.J.; VAN KNAPEN, F. In vitro study on the effect of organic acids on *Campylobacter jejuni/coli* populations in mixtures of water and feed. **Poultry Science**, v. 81, n. 5, p. 621-628, May 2002. DOI: <http://doi.org/10.1093/ps/81.5.621>

CHERRINGTON, C.A.; HINTON, M.; MEAD, G.C.; CHOPRA, I. Organic Acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. **Advances In Microbial Physiology**, v. 32, p. 87-108, 1991. DOI: [http://doi.org/10.1016/s0065-2911\(08\)60006-5](http://doi.org/10.1016/s0065-2911(08)60006-5).

CRUZ-POLYCARPO, V. C.; FRESCHI, J. B.; POLYCARPO, G. V.; ARAUJO, R. G. A. C.; BARBIERI, A.; SOUSA, R. L. M. Isolated and combined organic acids in diets of broiler chickens challenged with *Eimeria acervulina*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 72, n. 4, p. 1511-1521, ago. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-11647>.

DAI, D.; QIU, K.; ZHANG, H.; WU, S.; HAN, Y.; WU, Y.; QI, G.; WANG, J. Organic Acids as Alternatives for Antibiotic Growth Promoters Alter the Intestinal Structure and Microbiota and Improve the Growth Performance in Broilers. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 14 jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.618144>

DIBNER, J. J.; KNIGHT, C. D.; KITCHELL, M. L.; ATWELL, C. A.; DOWNS, A. C.; IVEY, F. J. Early feeding and development of the immune system in neonatal poultry. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 7, n. 4, p. 425-36, Dec. 1998.

DIBNER, J. J.; BUTTIN, P. Use of Organic Acids as a Model to Study the Impact of Gut Microflora on Nutrition and Metabolism. **Journal Of Applied Poultry Research**, v. 11, n. 4, p. 453-463, Dec. 2002. DOI: <http://doi.org/10.1093/japr/11.4.453>.

DREW, M. D.; SYED, N. A.; GOLDADE, B. G.; LAARVELD, B.; VAN KESSEL, A. G. Effects of Dietary Protein Source and Level on Intestinal Populations of *Clostridium perfringens* in Broiler Chickens. **Poultry Science**, v. 83, n. 3, p. 414-420, Mar. 2004. DOI: <http://doi.org/10.1093/ps/83.3.414>

DU, E.; GAN, L.; LI, Z.; WANG, W.; LIU, D.; GUO, Y. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.6, n. 58, p.1-12, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0055-7>

DUBOS, R.; SCHAEEDLER, R. W.; COSTELLO, R.; HOET, P. Indigenous, normal, and autochthonous flora of the gastrointestinal tract. **The Journal Of Experimental Medicine**, v. 122, n. 1, p. 67-76, 1 Jul. 1965. DOI: <http://doi.org/10.1084/jem.122.1.67>

DUKE, G. E. Digestão aviária. In: TRAMPEL, D. M.; DUKE, G. E. **Fisiologia dos animais domésticos**. 10. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. cap. 23, p. 450-461.

EMAMI, N. K.; NAEINI, S. Z.; RUIZ-FERIA, C.A. Growth performance, digestibility, immune response and intestinal morphology of male broilers fed phosphorus deficient diets supplemented with microbial phytase and organic acids. **Livest Science**, v.157, n. 2-3, p.506–513, Nov. 2013.

FASCINA, V. B. **Aditivos fitogênicos e ácidos orgânicos em dietas de frango de corte**. 2011. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MANDRELL, R. E. Antibacterial Activities of Phenolic Benzaldehydes and Benzoic Acids against *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella enterica*. **Journal Of Food Protection**, v. 66, n. 10, p. 1811-1821, Oct. 2003. DOI: <http://doi.org/10.4315/0362-028x-66.10.1811>

GOHARI, I. M.; NAVARRO, M. A.; LI, J.; SHRESTHA, A.; UZAL, F.; MCCLANE, B. A. Pathogenicity and virulence of *Clostridium perfringens*. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 723-753, Dec. 2021. DOI: <http://doi.org/10.1080/21505594.2021.1886777>

GOODARZI BOROOJENI, F.; MANNER, K.; RIEGER, J.; PÉREZ CALVO, E.; ZENTEK, J. Evaluation of a microbial muramidase supplementation on growth performance, apparent ileal digestibility, and intestinal histology of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 98, n.5, p. 2080–2086, May 2019. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pey556>

HALEVY, O.; GEYRA, A.; BARAK, M.; UNI, Z.; SKLAN D. Early posthatch starvation decreases satellite cells proliferation and skeletal muscle growth in chicks. **The Journal of Nutrition**, v. 130, n. 4, p. 858-64, Apr. 2000. DOI: <https://doi.org/10.1093/jn/130.4.858>

HASSAN, H. M. A.; MOHAMED, M. A.; YOUSSEF, Amani W.; HASSAN, Eman R.. Effect of Using Organic Acids to Substitute Antibiotic Growth Promoters on Performance and Intestinal Microflora of Broilers. **Asian-Australasian Journal Of Animal Sciences**, v. 23, n. 10, p. 1348-1353, 20 ago. 2010. DOI: <http://doi.org/10.5713/ajas.2010.10085>.

HODGES, R. D.; MICHAEL, E. Structure and histochemistry of the normal intestine of the fowl. **Cell And Tissue Research**, v. 160, n. 1, p. 125-138, Jun. 1975. DOI: <http://doi.org/10.1007/bf00219846>

HYUGHEBAERT, G.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. An update on alternatives to antimicrobial growth promoters for broilers. **The Veterinary Journal**, v. 187, n. 2, p. 182-188, Feb. 2011. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.tvjl.2010.03.003>.

IMMERSEEL, F. V.; ROODM, I.; MOORE, R.J.; TITBALL, R.W. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. **Trends in Microbiology**, v.17, n. 1, p.32-36, Jan. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.005>

ITO, N. M. K. *et al.* Saúde gastrointestinal, manejos e medidas para controlar as enfermidades gastrointestinais. In: MENDES, A. A.; NÄÄS, I. A.; MACARI, M. **Produção de frangos de corte**. Campinas: Facta, 2004. cap.13, p.207-215.

JEURISSEN, S. H.M.; LEWIS, F.; KLIS, J.D.V.; MROZ, Z.; REBEL, J.M.J., HUURNE, A. A.H.M. Parameters and Techniques to Determine Intestinal Health of Poultry as Constituted by Immunity, Integrity and Functionality. **Current Issues of Intestinal Microbiology**, v.3, n. 1, p. 1-14, 2002.

JOZEFIAK, D.; KACZMAREK, S.; BOCHENEK, M.; RUTKOWSKI, A. A note on effects of benzoic acid supplementation on the performance and microbiota populations of broiler chickens. **Journal Animal Feed Sciemem**, v.16, n. 2, p.252-256, 2007. DOI: DOI: <https://doi.org/10.22358/jafs/66746/2007>

KEYBURN, A. L.; SHEEDY, S. A.; FORD, M. E.; WILLIAMSON, M. M.; AWAD, M. M.; ROOD, J. I.; MOORE, R. J. Alpha-Toxin of *Clostridium perfringens* Is Not an Essential Virulence Factor in Necrotic Enteritis in Chickens. **Infection And Immunity**, v. 74, n. 11, p. 6496-6500, Nov. 2006. DOI: <http://doi.org/10.1128/iai.00806-06>

KEYBURN, A. L.; BOYCE, J. D.; VAZ, P.; BANNAM, T. L.; FORD, M. E.; PARKER, D. DI RUBBO, A. ROOD, J. I.; MOORE, R. J. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. **PLoS Pathogens**, v. 4, e26, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040026>

KHAN, S. H.; IQBAL, J. Recent advances in the role of organic acids in poultry nutrition. **Journal Of Applied Animal Research**, v. 44, n. 1, p. 359-369, 2016. DOI: <http://doi.org/10.1080/09712119.2015.107952>

KIU, R.; BROWN, J.; BEDWELL, H.; LECLAIRE, C.; CAIM, S.; PICKARD, D.; DOUGAN, G.; DIXON, R. A.; HALL, L. J. Genomic analysis on broiler-associated *Clostridium perfringens* strains and exploratory caecal microbiome investigation reveals key factors linked to poultry necrotic enteritis. **Animal Microbiome**, v. 1, n. 1, 18 Oct. 2019. DOI: <http://doi.org/10.1186/s42523-019-0015-1>

KRISHAN, G.; NARANG, A. Use of essential oils in poultry nutrition: a new approach. **Journal Of Advanced Veterinary And Animal Research**, v. 1, n. 4, p. 156, 2014. DOI: <http://doi.org/10.5455/javar.2014.a36>

LEPP, D., ROXAS, B.; PARREIRA, V. R.; MARRI, P. R.; ROSEY, E. L.; GONG, J.; SONGER, J. G.; VEDANTAM, G.; PRESCOTT, J. F. Identification of novel pathogenicity loci in *Clostridium perfringens* strains that cause avian necrotic enteritis. **PLoS One**, v. 5, n. 6, e10795, Jun. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0010795>

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica**. 2. ed. Traduzido por A. A. Simões e W. R. N. Lodi. São Paulo: Sarvier, 1995.

LICHTENBERG, J.; PEREZ CALVO, E.; MADSEN, K.; OSTERGAARD LUND, T.; KRAMER BIRKVED, F.; VAN CAUWENBERGHE, S.; MOURIER, M.; WULFANDERSEN, L.; JANSMAN, A.J.M.; LOPEZ-ULIBARRI. Safety evaluation of a novel muramidase for feed application. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 89, p. 57–69, Oct. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.07.014>

LIU, Y.; ESPINOSA, C. D.; ABELILLA, J. J.; CASAS, G. A.; LAGOS, L. V.; LEE, S. A.; KWON, W. B.; MATHAI, J. K.; NAVARRO, D. M. D. L.; JAWORSKI, N. W.; STEIN, H. H. Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 113–125, Jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.007>

LIU, D.; GUO, Y.; WANG, Z.; YUAN, J. Exogenous lysozyme influences Clostridium perfringens colonization and intestinal barrier function in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 39, n.1, p.17.24, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079450903447404>

LIU, Y.; YANG, X.; XIN, H.; CHEN, S.; YANG, C.; DUAN, Y.; YANG, X. Effects of a protected inclusion of organic acids and essential oils as antibiotic growth promoter alternative on growth performance, intestinal morphology and gut microflora in broilers. **Animal Science Journal**, v. 88, n. 9, p. 1414-1424, 20 mar. 2017. DOI: <http://doi.org/10.1111/asj.12782>

MACARI, M.; FURLAN R. L.; GONZALES, E. (ed.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, 2002.

MAYER, C. Bacterial cell wall recycling. In: **ENCYCLOPEDIA of Life Sciences**. Hoboken: Wiley, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1002/9780470015902.a0021974>

MORAN JR., E. T. Nutrition of the Developing Embryo and Hatchling. **Poultry Science**, v. 86, n. 5, p.1043-1049, May 2007. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/86.5.1043>

NASERI, K. G.; RAHIMI, S.; KHAKI, P. Comparison of the effects of probiotic, organic acid and medicinal plant on *Campylobacter jejuni* challenged broiler chickens. **Journal Agriculture Science Technology**, v.14, p.1485–1496, 2012.

OVIEDO-RONDÓN, E. O. Holistic view of intestinal health in poultry. **Animal Feed Science And Technology**, v. 250, p. 1-8, Apr. 2019. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2019.01.009>

PELICANO, E. R. L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H. B. A.; OBA, A.; NORKUS, E. A.; KODAWARA, L. M.; LIMA, T. M. A. Morfometria e ultra-estrutura da mucosa intestinal de frangos de corte alimentados com dietas contendo diferentes probióticos. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v.98, n.547, p.125-134, 2003.

PEREIRA, R.; MENTEN, J.F.M.; BORTOLUZZI, C.; NAPTY, G.S.; LONGO, F.A.; VITTORI, J.; LOURENÇO, M.C.; SANTIN, E. Organic acid blend in diets of broiler

chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Journal Of Applied Poultry Research**, v. 24, n. 3, p. 387-393, Sep. 2015. DOI: <http://doi.org/10.3382/japr/pfv041>

PHAM, V.H.; KAN, L.; HUANG, J.; GENG, Y.; ZHEN, W.; GUO, Y.; ABBAS, W.; WANG, Z. Dietary encapsulated essencial oils and organic acids mixture improves gut health in broiler chickens challenged with necrotic enteritis. **Journal of Animal Science Biotechnology**, v. 11, p.1-18, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0421-y>

PIRGOLIEV, V.; SIMIC, A.; ROSE, S. P.; CALVO, E. Pérez. Dietary microbial muramidase improves feed efficiency, energy and nutrient availability and welfare of broilers fed commercial type diets containing exogenous enzymes. **British Poultry Science**, v. 62, n. 1, p. 131-137, 2021. DOI: <http://doi.org/10.1080/00071668.2020.1817330>

PRESCOTT, J. F.; PARREIRA, V. R.; GOHARI, M.I.; LEPP, D.; GONG, J. The Pathogenesis of Necrotic Enteritis in Chickens: What We Know and What We Need to Know: A Review. **Avian Pathology**, v. 45, n. 3, p. 288–294, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457.2016.1139688>

RICKE, Sc. Perspectives on the use of organic acids and short chain fatty acids as antimicrobials. **Poultry Science**, v. 82, n. 4, p. 632-639, Apr. 2003. DOI: <http://dx.doi.org/10.1093/ps/82.4.632>.

ROOD, J.I.; ADAMS, V.; LACEY, J.; LYRAS, D.; McClane, B.A.; MELVILLE, S.B.; MOORE, R.J.; POPOFF, M.R.; SARKER, M.R.; SONGER, J.G.; UZAI, F.A.; VAN IMMERSEEL, F. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. **Anaerobe**, v.53, p.5–10, Oct. 2018.

RUSSELL, J. B. Another explanation for the toxicity of fermentation acids at low pH: anion accumulation versus uncoupling. **Journal Of Applied Bacteriology**, v. 73, n. 5, p. 363-370, Nov. 1992. DOI: <http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb04990.x>

SAIS, M.; BARROETA, A.C.; LÓPEZ-COLOM.; NOFRARÍAS, M.; MAJÓ, N.; LOPEZ-ULIBARRI, R.; PÉREZ CALVO, E.; MARTÍN-ORÚE, S.M. Evaluation of dietary supplementation of a novel microbial muramidase on gastrointestinal functionality and growth performance in broiler chickens. **Poultry Science**, v. 99, n. 1, p. 235–245, Jan. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pez466>

SALEEM, K; SAIMA; RAHMAN, A.; PASHA, T. N.; MAHMUD, A.; HAYAT, Z. Effects of dietary organic acids on performance, cecal microbiota, and gut morphology in broilers. **Tropical Animal Health And Production**, v. 52, n. 6, p. 3589-3596, Sep. 2020. DOI: <http://doi.org/10.1007/s11250-020-02396-2>

SANTHIAS, P. H. **Santa Catarina registra alta de 27,8% no faturamento com exportações de carne de frango**. Florianópolis: Secretaria de Estado da Agricultura, 24 mar. 2023. Disponível em: <https://Santa Catarina registra alta de 27,8% no faturamento com exportações de carne de frango – Secretaria da Agricultura. Acesso em: 01 abr. 2023.>

SCHNEEMAN, B. O.; RICHTER, B. D.; JACOBS, L. R. Response to Dietary Wheat Bran in the Exocrine Pancreas and Intestine of Rats. **The Journal Of Nutrition**, v. 112, n. 2, p. 283-286, fev. 1982. DOI: <http://doi.org/10.1093/jn/112.2.283>

SHAHIDI, S.; MAZIAR, Y.; DELARAM, N. Z. Influence of Dietary Organic Acids Supplementation on Reproductive Performance of Freshwater Angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Global Veterinaria**, v. 13, n. 3, p. 373–377, 2014. DOI: 10.5829/idosi.gv.2014.13.03.84297

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia**: do produto natural ao medicamento Porto Alegre: Artmed, 2017.

SMYTH, C.; BRUNTON, N.; FOGARTY, C.; BOLTON, D. The Effect of Organic Acid, Trisodium Phosphate and Essential Oil Component Immersion Treatments on the Microbiology of Cod (*Gadus morhua*) during Chilled Storage. **Foods**, v. 7, n. 12, p. 200, 8 Dec. 2018. DOI: <http://doi.org/10.3390/foods7120200>

SOHAIL, R.; SAEED, M.; CHAO, S.; SOOMRO, R. N.; ARAIN, M. A.; ABBASI, I. H. R.; RAZA, S.; LU, G.; YOUSAF, M. Comparative effect of different organic acids (benzoic, acetic and formic) on growth performance, immune response and carcass traits of broilers. **Journal of Animal Production Advances**, v. 5, n. 9, p. 757–764. 2015.

STANLEY, D.; WU, S. B.; RODGERS, N.; SWICK, R. A.; MOORE, R. Differential responses of cecal microbiota to fishmeal, *Eimeria* and *Clostridium perfringens* in a necrotic enteritis challenge model in chickens. **PloS one**, v. 9, n. 8, e104739, 28 Aug. 2014. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0104739>

STEFANELLO, C.; ROSA, D. P.; DALMORO, Y. K.; SEGATTO, A. L.; VIEIRA, M. S.; MORAES, M. L.; SANTIN, E. Protected Blend of Organic Acids and Essential Oils Improves Growth Performance, Nutrient Digestibility, and Intestinal Health of Broiler Chickens Undergoing an Intestinal Challenge. **Frontiers In Veterinary Science**, v. 6, 10 Jan. 2020. DOI: <http://doi.org/10.3389/fvets.2019.00491>.

STURKIE, P. D. **Avian physiology**. 4. ed. New York: Springer-Verlag, 1986.

SVIHUS, B.. Function of the digestive system. **Journal Of Applied Poultry Research**, v. 23, n. 2, p. 306-314, jun. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.3382/japr.2014-00937>

THOMPSON, J. L.; HINTON, M. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on salmonellas in the crop. **British Poultry Science**, v. 38, n. 1, p. 59-65, Mar. 1997. DOI: <http://doi.org/10.1080/00071669708417941>

TO, H.; SUZUKI, T.; KAWAHARA, F.; UETSUKA, K.; NAGAI, S.; NUNOYA, T. Experimental induction of necrotic enteritis in chickens by a netB-positive Japanese isolate of *Clostridium perfringens*. **Journal Of Veterinary Medical Science**, v. 79, n. 2, p. 350-358, 2017. DOI: <http://doi.org/10.1292/jvms.16-0500>

UNI, Z.; GANOT, S.; SKALAN, D. Posthatch development of mucosa function in the broilers small intestine **Poultry Science**, v.77, n.1, p. 75-82, Jan. 1998. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/77.1.75>

UPADHAYA, S. D.; CHO, S. H.; CHUNG, T. K.; KIM, I. H. Anti-coccidial effect of essential oil blends and vitamin D on broiler chickens vaccinated with purified mixture of coccidian oocyst from *Eimeria tenella* and *Eimeria maxima*. **Poultry Science**, v. 98, n. 7, p. 2919-2926, Jul. 2019. <http://doi.org/10.3382/ps/pez040>

VAN IMMERSEEL, F.; RUSSELL, J. B.; FLYTHE, M. D.; GANTOIS, I.; TIMBERMONT, L.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.. The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. **Avian Pathology**, v. 35, n. 3, p. 182-188, Jun. 2006. DOI: <http://doi.org/10.1080/03079450600711045>.

VIOLA, E. S.; VIEIRA, S. L. Suplementação de acidificantes orgânicos e inorgânicos em dietas para frangos de corte: desempenho zootécnico e morfologia intestinal. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 36, n. 4, p. 1097-1104, ago. 2007. DOI: <http://doi.org/10.1590/s1516-35982007000500016>

VOLLMER, W.; BLANOT, D.; PEDRO, M. A. Peptidoglycan structure and architecture. **FEMS Microbiology Reviews**, v.32, n.2, p. 149–167, Mar. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>

WADE, B.; KEYBURN, A. L. The true cost of necrotic enteritis. **World Poultry**, n.31, p.16-17, 2015.

WENK, C. Herbs and Botanicals as Feed Additives in Monogastric Animals. **Asian-Australasian Journal Of Animal Sciences**, v. 16, n. 2, p. 282-289, 1 jan. 2003. DOI: <http://doi.org/10.5713/ajas.2003.282>

WHEELER, R.; CHEVALIER, G.; EBERL, G.; GOMPERTS, I. The biology of bacterial peptidoglycans and their impact on host immunity and physiology. **Cellular Microbiology**, v. 16, n. 7, p. 1014–1023, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1111/cmi.12304>

YANG, W.-Y.; LEE, Y.; LU, H.; CHOU, C.-H.; WANG, C. Analysis of gut microbiota and the effect of lauric acid against necrotic enteritis in *Clostridium perfringens* and *Eimeria* side-by-side challenge model. **Plos One**, v. 14, n. 5, p. e0205784, 31 May 2019. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0205784>

YIN, D.; DU, E.; YUAN, J.; GAO, J; WANG, Y.; AGGREY, S. E.; GUO, Y. Supplemental thymol and carvacrol increases ileum *Lactobacillus* population and reduces effect of necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens* in chickens. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-11, Aug. 2017. DOI: <http://doi.org/10.1038/s41598-017-07420-4>.

YOUSAF, M. S.; BOROOJENI, F. G.; VAHJEN, W.; MÄNNER, K.; HAFEEZ, A.; UR-REHMAN, H.; KELLER, S.; PERIS, S.; ZENTEK, J. Encapsulated benzoic acid supplementation in broiler diets influences gut bacterial composition and activity. **British**

Poultry Science, v. 58, n. 2, p. 122-131, 18 Jan. 2017. DOI:
<http://doi.org/10.1080/00071668.2016.126200>

YU, Q.; LEPP, D.; MEHDIZADEH GOHARI, I.; WU, T.; ZHOU, H.; YIN, X.; YU, H.; PRESCOTT, J. F.; NIE, S. P.; XIE, M. Y.; GONG, J. The Agr-like quorum sensing system is required for necrotic enteritis pathogenesis in poultry caused by *Clostridium perfringens*. **Infection Immunity**, v. 85, n. 6, e00975-16, 2017. DOI:
<https://doi.org/10.1128/iai.00975-16>

ZHAI, H.; LIU, H.; WANG, S.; WU, J.; KLUENTER, A.-M. Potential of essential oils for poultry and pigs. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 179-186, Jun. 2018. DOI:
<http://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.005>

ZHOU, H.; LEPP, D.; PEI, Y.; LIU, M.; YIN, X.; MA, R.; PRESCOTT, J. F.; GONG, J. Influence of pCP1NetB ancillary genes on the virulence of *Clostridium perfringens* poultry necrotic enteritis strain CP1. **Gut Pathog**, v. 9m n. 6, 2017. DOI:
<https://doi.org/10.1186/s13099-016-0152-y>

5 USO DE ÁCIDO BENZOICO ASSOCIADO BLEND ÓLEOS ESSENCIAIS E ENZIMA MURAMIDASE EM FRANGOS DE CORTE DESAFIADOS POR *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS*

5.1 RESUMO

A enterite necrótica (EN) causada por *Clostridium perfringens* é uma doença com grande importância para avicultura, a qual se caracteriza pelo aumento das taxas de mortalidade e baixo desempenho zootécnico. Durante décadas, os antibióticos promotores de crescimento (APCs), usados em larga escala na alimentação animal, ajudaram a controlar a EN, no entanto com as proibições do uso, houve um aumento nos distúrbios entéricos relacionados ao *Clostridium perfringens* e ao desenvolvimento da enterite necrótica. Como alternativa ao uso de APCs, um grande número de aditivos alimentares como prebióticos, probióticos, fitobióticos, óleos essenciais, enzimas e ácidos orgânicos são utilizados nas dietas avícolas, com o objetivo de melhorar a microbiota intestinal e aumentar a digestibilidade dos nutrientes, melhorando consequentemente o desempenho zootécnico das aves. Objetivou-se através deste trabalho avaliar os efeitos dos aditivos ácido benzoico blend óleos essenciais e enzima muramidase sobre o ganho de peso vivo, ganho de peso médio diário, peso relativo dos órgãos (duodeno, jejuno, íleo e fígado), avaliar o grau de severidade das lesões intestinais e avaliar a morfometria das vilosidades em frangos de corte desafiados por *Clostridium perfringens*. Para o experimento *in vivo*, foram utilizados 384 pintinhos de um dia, machos, distribuídos em 24 metabólicas (1,0 X 0,5 m). Nas dietas experimentais utilizou-se um ácido orgânico, composto por ácido benzóico (83%), timol (1,9%), eugenol (1%), benzilsalicilato (0,3%) e piperina (0,1%), na concentração de 300 ppm e a enzima muramidase, na concentração de 350 ppm. As aves foram distribuídas em cinco tratamentos, sendo: Controle negativo (CN) no qual as aves receberam uma dieta basal sem a inclusão de aditivos e não desafiadas; Controle positivo (CP), onde as aves receberam dieta basal sem aditivos e desafiadas por *Clostridium perfringens*; o terceiro tratamento (CPA) as aves que receberam dieta basal, com a adição de 300 g/tonelada do ácido benzoico associado blend óleos essenciais e desafiadas por *Clostridium perfringens*; o quarto tratamento (CPM) os animais receberam a dieta basal com a adição

de 350 g/tonelada da enzima muramidase e desafiadas por *Clostridium perfringens*; e o último tratamento (CPA+CPM) que recebeu dieta basal, com a adição de 300 g/tonelada do ácido benzoico blend a óleos essenciais e 350 g/tonelada da enzima muramidase e desafiadas por *Clostridium perfringens*. As aves dos tratamentos CP, CPA, CPM e CPA+CPM foram desafiadas aos 5 dias de idade com 3 mL de um inóculo na concentração final de $3,4 \times 10^7$ UFC/ml, isolado de campo, pela via oral. Foram necropsiadas duas (2) aves de cada tratamento no 8º, 10º, 15º, 20º, 30º e 38º dia de vida das aves. Realizou-se coletas e pesagens dos órgãos, em balança digital, das porções dos segmentos intestinais (duodeno, jejuno, íleo e ceco) e fígado. Para a realização das análises histopatológicas, os fragmentos de intestinos (duodeno, jejuno, íleo e ceco) foram coletados e fixados em formol tamponado a 10% e processados. O experimento foi conduzido utilizando um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições. Os dados foram submetidos ao teste de normalidade e análise de variância e quando houve diferença significativa ($P < 0,05$), as médias foram comparadas pelo teste de Tukey. Observou-se através dos resultados que o ácido benzoico associado a óleos essências e a enzima muramidase influenciaram positivamente sobre o peso médio das aves de 21 dias e sobre o ganho de peso médio diários das aves de 14-21 dias desafiadas por *Clostridium perfringens*. E na porção do jejuno, enzima muramidase influenciou positivamente sobre a diferenciação da mucosa intestinal e um maior ganho de peso médio vivo e ganho de peso médio diário nos 35 e 38 dias foi observado.

Palavra-chave: Aditivos; Ganho de peso, Microscopia, Morfometria intestinal.

5.2 ABSTRACT

Necrotic enteritis (NE) caused of *Clostridium perfringens* is a disease of great importance for poultry farming, which is characterized by increased mortality rates and low zootechnical performance. For decades antibiotics growth promoters (AGPs), used on a large scale in animal feed, helped control NE, however, with bans on their use, there was an increase in enteric disorders related to *Clostridium perfringens* and the development of necrotic enteritis. As an alternative to the use of AGPs, a large number of food additives such as prebiotics, probiotics, phytobiotics, essential oils, enzymes and organic acids are used in poultry diets, with the aim of improving the intestinal microbiota and increasing the digestibility of nutrients, consequently improving the zootechnical performance of birds. The objective of this work was to evaluate the effects of additives benzoic acid associated with essential oils and muramidase enzyme on average live weight gain, average daily weight gain, relative weight of organs (duodenum, jejunum, ileum and liver), evaluate the degree of severity of intestinal lesions and evaluate the morphometry of the villi in broiler chickens challenged of *Clostridium perfringens*. For the in vivo experiment, 384 one-day-old male chicks were used, distributed in 24 cages (1.0 x 0.5 m). In the experimental diets, an organic acid was used, composed of benzoic acid (83%), thymol (1.9%), eugenol (1%), benzylsalicylate (0.3%) and piperine (0.1%), in concentration of 300 ppm and the enzyme muramidase, at a concentration of 350 ppm. The birds were distributed into five treatments, as follows: Negative control (CN) in which the birds received a basal diet without the inclusion of additives and were not challenged; Positive control (CP), where birds received a basal diet without additives and challenged of *Clostridium perfringens*; the third treatment (CPA) included birds that received a basal diet, with the addition of 300 g/ton of benzoic acid associated with essential oils and challenged of *Clostridium perfringens*; the fourth treatment (CPM) received a basal diet with the addition of 350 g/ton of the muramidase enzyme and challenged of *Clostridium perfringens*; and the last treatment (CPA+CPM) which received a basal diet, with the addition of 300 g/ton of benzoic acid associated with essential oils and 350 g/ton of the enzyme muramidase and challenged of *Clostridium perfringens*. The preparation of the *Clostridium perfringens* culture to be administered to the experimental birds was made

from a *C.perfringens* field isolate and the birds in the CP, CPA, CPM and CPA+CPM treatments were challenged at 5 days of age with 3 mL of an inoculum at a final concentration of 3.4×10^7 CFU/ml, according to the Mac Farland scale, orally. Two (2) birds from each treatment were necropsied on the 8th, 10th, 15th, 20th, 30th and 38th day of the birds' life. Organs were collected and weighed, on a digital scale, from portions of the intestinal segments (duodenum, jejunum, ileum and cecum) and liver. To carry out histopathological analyses, fragments of intestines (duodenum, jejunum, ileum and cecum) were collected and fixed in 10% buffered formalin and processed. The experiment was conducted using a completely randomized design, with six treatments and five replications. The data were subjected to the normality test and analysis of variance and when there was a significant difference ($P < 0.05$), the means were compared using the Tukey test. It was observed through the results that benzoic acid associated with essential oils and the muramidase enzyme had a positive influence on the average weight of 21-day-old birds and on the average daily weight gain of 14-21-day-old birds challenged by *Clostridium perfringens*. And in the jejunum portion, muramidase enzyme positively influenced the differentiation of the intestinal mucosa and a greater gain in average live weight and average daily weight gain on 35 and 38 days was observed.

Keywords: Additives; Weight gain, Microscopy, Intestinal morphometry.

5.3 INTRODUÇÃO

A manutenção de um ambiente intestinal saudável é de extrema importância para garantir um bom desempenho zootécnico em frangos de corte. Os antibióticos promotores de crescimento (APCs) tem sido utilizados com esta finalidade desde meados da década de 1940, garantindo a manutenção de um ambiente intestinal saudável e garantindo os mais altos níveis zootécnicos (Murugesan *et al.*, 2015) Contudo, mercados consumidores internacionais, principalmente a União Europeia, tem banido o uso de APCs na produção avícola, visto que seu uso em larga escala na alimentação animal tem elevado às preocupações mundiais, pela presença de resíduos em carne e ovos e por possível promoção de resistência bacteriana (Fascina, 2011), se tornando um assunto interesse em saúde pública e em saúde animal. A restrição fez com que aumentasse a procura por produtos alternativos que sejam capazes de melhorar a saúde dos animais e garantir os mais altos níveis de produção e desempenho zootécnico de frangos de corte.

A enterite necrótica (EN) causada por *Clostridium perfringens* é uma doença com grande importância para avicultura, a qual se caracteriza pelo aumento das taxas de mortalidade e baixo desempenho zootécnico (Timbermont *et al.*, 2011). Durante décadas os antibióticos promotores de crescimento, usados em larga escala na alimentação animal, ajudaram a controlar a EN, no entanto com as proibições do uso, houve um aumento nos distúrbios entéricos relacionados ao *Clostridium perfringens* e ao desenvolvimento da enterite necrótica (Immerseel, *et al.*, 2008).

Como alternativa ao uso de APCs, um grande número de aditivos alimentares como prebióticos, probióticos, fitobióticos, óleos essenciais, enzimas e ácidos orgânicos são utilizados nas dietas avícolas, com o objetivo de melhorar a microbiota intestinal e aumentar a digestibilidade dos nutrientes (Wenk, 2003), melhorando consequentemente o desempenho zootécnico das aves (Thompson; Hinton, 1997). O uso de enzimas nas formulações de rações para animais, cada vez mais tem se tornado comum, às quais otimizam os valores nutricionais das dietas (Lichtenberg *et al.*, 2017).

Uma gama de enzimas está disponível para utilização em rações, dentre elas podemos destacar a Muramidase (EC 3.2.1.17), também conhecida como lisozima ou N-acetilmuramidase, a qual recentemente ganhou interesse como potencial aditivo

alimentar (Long *et al.*, 2016; May *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2010). Muramidases clivam às ligações glicosídicas β -1,4 entre o ácido N-acetilmuramico e a N-acetilglucosamina, as quais são os elementos básicos do esqueleto do peptideoglicano, um importante componente da parede celular bacteriana. A catálise do peptideoglicano no trato digestivo dos animais, através da suplementação dietética da muramidase, pode ser benéfica para o animal, tendo em vista um efeito positivo para a eficiência alimentar (Oliver *et al.*, 2014; Oliver; Wells, 2013; May *et al.*, 2012).

Verificou-se que o tratamento com ácidos orgânicos compostos de ácidos individuais ou misturas de ácidos, realizam atividades antimicrobianas semelhantes às dos antimicrobianos (Wang *et al.*, 2009). Como um grupo de produtos químicos, os ácidos orgânicos são considerados qualquer ácido carboxílico da estrutura geral R-COOH (incluindo ácidos graxos e aminoácidos). Os ácidos de cadeia curta (C1–C7) estão associados à atividade antimicrobiana (Shahidi *et al.*, 2014).

A adição de ácidos orgânicos na dieta pode ter um efeito benéfico sobre o desempenho das aves, diminuindo a colonização intestinal por bactérias patogênicas. As bactérias que comumente afetam a saúde intestinal das aves são a *Salmonella*, *Campylobacter*, *Clostridium perfringens* e *Escherichia coli*, as quais podem ser controladas com a suplementação de ácidos orgânicos na dieta (Dai, *et al.*, 2021; Naseri; Rahimi; Khaki, 2012; Van Immerseel *et al.*, 2006).

O ácido benzoico e os óleos essenciais possuem característica lipofílica e quando não dissociados podem difundir-se através da membrana celular bacteriana, alterando a sua permeabilidade. A liberação de íons H⁺ dentro da célula faz com que a bactéria retome a homeostase e remova prótons através da bomba Na⁺/K⁺ (Rodrigues *et al.*, 2020). O processo ativo promove a depleção bacteriana, comprometendo seus processos vitais e diminui sua patogenicidade, possuindo efeito bactericida ou bacteriostático (Liu *et al.*, 2018; Suiryana; Ramana, 2015). Assim, a associação de ácido benzoico e óleos essenciais apresenta atividade sinérgica, na qual os óleos possuem capacidade de danificar e tornar as paredes celulares bacterianas dos organismos patogênicos mais permeáveis, permitindo assim, maior entrada e dissociação do ácido no interior da célula (Zhai *et al.*, 2020).

5.4 MATERIAL E MÉTODOS

O projeto foi submetido à análise do Comitê de Ética no Uso de Animais e aprovado sob o número CEUA Nº 5610260221. Foi realizado um ensaio em gaiolas de metabolismo em um aviário de aves comerciais, dispondo o experimento em um delineamento inteiramente casualizado, utilizando 24 gaiolas metabólicas (1,0 X 0,5 m), às quais eram dotadas de um comedouro tipo calha frontal, dois bebedouros tipo *nipple* acoplados a um reservatório individual de água. O ambiente permaneceu climatizado de acordo com a temperatura de conforto para a idade das aves, seguindo o manual da linhagem ROSS 95 (Aviagem, 2018).

Para o experimento *in vivo*, foram utilizados 384 pintinhos de um dia, machos, vacinados contra Doença de Marek, Gumboro, Bouba Aviária e Bronquite Infecciosa. As aves receberam água filtrada e clorada (5 ppm) e ração isonutritiva (**Tabela 2**) *ad libitum*. Os pintos foram pesados individualmente nas gaiolas de modo que o peso corporal médio inicial das aves não variasse significativamente ($P>0,05$), sendo a média inicial do peso das aves de 45 g.

Tabela 2 - Composição percentual das rações experimentais isonutritivas

Ingredientes (%)	Idade (dias)		
	1-21 (Inicial)	22-35 (Crescimento)	36-38 (Final)
Milho	58,5	62,8	67,1
Farelo de soja	35,9	30,3	27,1
Óleo de Soja	0,94	2,99	2,85
Fosfato Bicalcico	1,94	1,81	1,67
Calcário Calcítico	0,94	0,73	0,69
Sal Comum	0,53	0,49	0,46
DL-Metionina	0,37	0,24	0,24
Lisina	0,41	0,25	0,31
Treonina	0,14	0,05	0,07
Premix vitaminínico/mineral	0,40 ¹	0,40 ²	0,40 ³
Total (%)	100,00	100,00	100,00
Cálculo da composição química			
Energia metabolizável (Mcal/kg)	2,96	3,15	3,20
Proteína Bruta (%)	22,1	19,7	18,30
Cálcio (%)	0,94	0,83	0,77
Fósforo disponível	0,47	0,41	0,38
Lisina Disponível	1,36	1,09	1,04
Cloreto (%)	0,22	0,20	0,19
Metionina + Cisteina disponível	0,96	0,79	0,75
Treonina Disponível	0,88	0,71	0,68
Triptofano Disponível	0,24	0,18	0,17
Sódio (%)	0,22	0,20	0,19
Ácido Linoleico	1,08	1,05	1,02

1 Suplemento vitamínico/mineral (Inicial) Colina 1382,64 mg, Vitamina A 6804,00 UI, Vitamina D3 2552,50 UI, Vitamina E 39,69 UI, Vitamina K3 4,25 mg, Vitamina B1 1,70 mg, Vitamina B2 4,54 mg, Vitamina B6 2,84 mg, Vitamina B12 0,01 µg, Niacina 34,02 mg, Ácido Fólico 1,13 mg, Ácido Pantotênico 11,34 mg, Biotina 0,11 mg, 25- Hldroxicolecalciferol 1738,80 mg, BHT 6,00 mg, Ácido Benzoico 300 mg, Enzima Muramidase 350 mg, Fitase 1500,00 FTU, Xinalase 2000,00 µ, Manganês 67,37 mg, Selênio 0,24 mg, Iodo 0,68 mg, Ferro 28,35 mg, Cobre 132,00 mg, Zinco 56,70 mg

2 Suplemento vitamínico/mineral (Crescimento) Colina 1218,75 mg, Vitamina A 6804,00 UI, Vitamina D3 2551,50 UI, Vitamina E 39,69 UI, Vitamina K3 4,25 mg, Vitamina B1 1,70 mg, Vitamina B2 4,54 mg, Vitamina B6 2,84 mg, Vitamina B12 0,01 µg, Niacina 34,02 mg, Ácido Fólico 1,13 mg, Ácido Pantotênico 11,34 mg, Biotina 0,11 mg, 25- Hldroxicolecalciferol 1738,80 mg, BHT 6,00 mg, Ácido Benzoico 300 mg, Muramidase 350 mg, Fitase 1500,00 FTU, Xinalase 2000,00 µ, Manganês 67,37 mg, Selênio 0,24 mg, Iodo 0,68 mg, Ferro 28,35 mg, Cobre 132,80 mg, Zinco 56,70 mg

3 Suplemento vitamínico/mineral (Final) Colina 1071,63 mg, Vitamina A 6804,00 UI, Vitamina D3 2551,50 UI, Vitamina E 39,69 UI, Vitamina K3 4,25 mg, Vitamina B1 1,70 mg, Vitamina B2 4,54 mg, Vitamina B6 2,84 mg, Vitamina B12 0,01 µg, Niacina 34,02 mg, Ácido Fólico 1,13 mg, Ácido Pantotênico 11,34 mg, Biotina 0,11 mg, 25- Hldroxicolecalciferol 1738,80 mg, BHT 6,00 mg, Ácido Benzoico 300 mg, Muramidase 350 mg, Fitase 1500,00 FTU, Xinalase 2000,00 µ, Manganês 65,29 mg, Selênio 0,24 mg, Iodo 0,68 mg, Ferro 28,35 mg, Cobre 6,80 mg, Zinco 56,70 mg

Figura 1 - Aves distribuídas em gaiolas metabólicas, com bebedouros tipo nipple, um reservatório acoplado e comedouros tipo calha



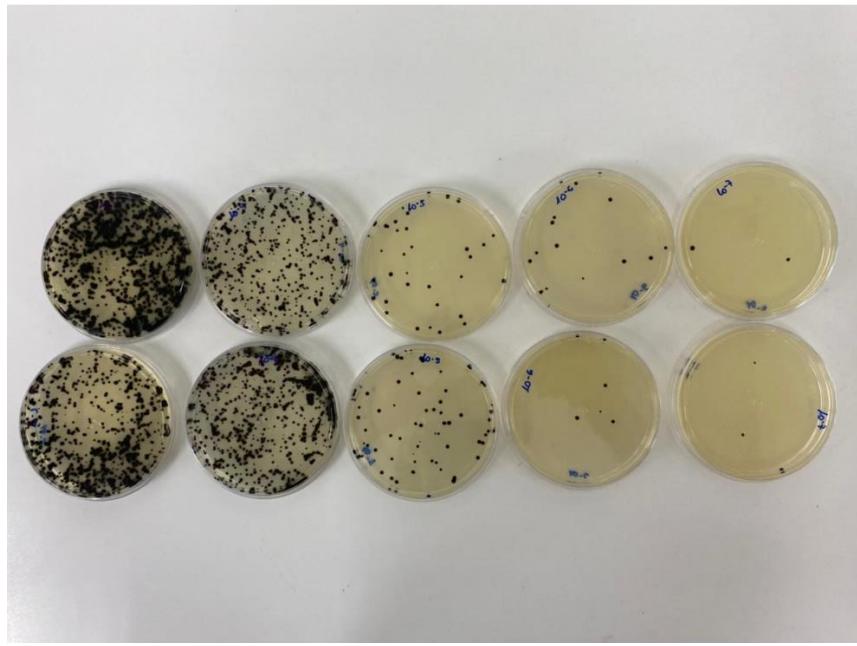
Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

Nas dietas experimentais utilizou-se um ácido orgânico, composto por ácido benzóico (83%), timol (1,9%), eugenol (1%), benzilsalicilato (0,3%) e piperina (0,1%), na concentração de 300 ppm e a enzima muramidase, na concentração de 350 ppm. As aves foram distribuídas em cinco tratamentos, sendo: Controle negativo (CN) no qual as aves receberam uma dieta basal sem a inclusão de aditivos e não desafiadas; Controle positivo (CP), onde as aves receberam dieta basal sem aditivos e desafiadas por *Clostridium perfringens*; o terceiro tratamento (CPA) as aves que receberam dieta basal, com a adição de 300 g/tonelada do ácido benzoico associado a óleos essenciais e desafiadas por *Clostridium perfringens*; o quarto tratamento (CPM) recebeu dieta basal com a adição de 350 g/tonelada da enzima muramidase e desafiadas por *Clostridium perfringens*; e o último tratamento (CPA+CPM) que recebeu dieta basal, com a adição de 300 g/tonelada do ácido benzoico associado a óleos essenciais e 350 g/tonelada da enzima muramidase e desafiadas por *Clostridium perfringens*. As dietas foram formuladas conforme a necessidade nutricional de cada fase de vida da ave, de acordo com recomendações de Rostagno (2017), sendo que o experimento teve duração de 38 dias.

5.5 INOCULAÇÃO DAS AVES

Seguindo recomendações de Schochen-Iturrino *et al.* (2004), o preparo da cultura do *Clostridium perfringens* a ser ministrado às aves do experimento, foi feito a partir de um isolado de campo *C. perfringens*, previamente armazenado em freezer -70 no laboratório de Saúde Animal (Empresa Privada A). A cepa foi ativada em BHI (*Brain Heart Infusion*) e incubada a uma temperatura de 37°C por 48 horas. Após incubação, a cultura foi repicada em um novo BHI e novamente foi incubada por 48 horas a 37°C. Em seguida foi realizada a contagem bacteriológica padrão das colônias características de *Clostridium perfringens*, as quais apresentaram coloração negra, com tamanho variante entre 1 a 3 mm, em placa contendo meio de SPS (Perfringens Selective Agar), através do método “pour plate”.

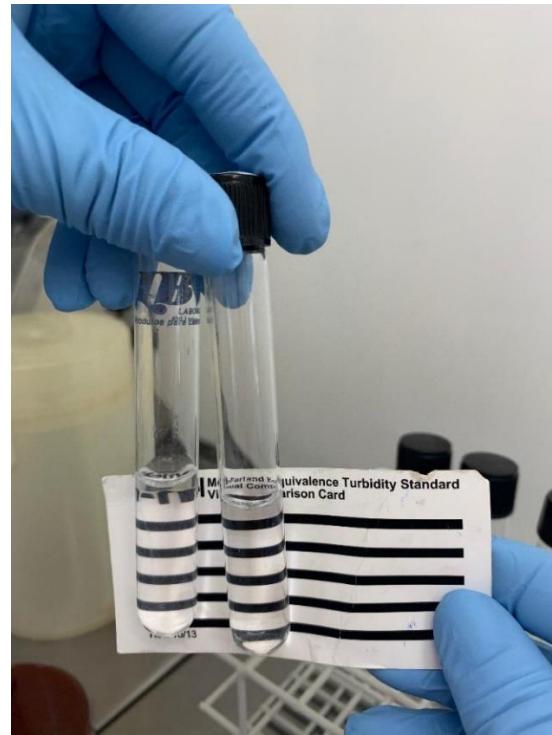
Figura 2 - Colônias características de *Clostridium perfringens* apresentando coloração negra, com tamanho variante entre 1 a 3 mm, em placas contendo meio de SPS



Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

Às aves dos tratamentos CP, CPA, CPM e CPA+CPM foram desafiadas aos 5 dias de idade com 3 mL de um inóculo na concentração final de $3,4 \times 10^7$ UFC/mL, de acordo com a escala de Mac Farland, pela via oral (**Figura 3**).

Figura 3 - Inóculo de *Clostridium perfringens* na concentração final de $3,4 \times 10^7$ UFC/mL, de acordo com a escala de Mac Farland



Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

Figura 4 - Inóculo de Clostridium perfringens administrado, por via oral, com auxílio de pipeta, introduzida até o papo das aves



Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

Este procedimento foi realizado com o auxílio de uma pipeta a qual foi introduzida até o papo das aves.

5.6 AVALIAÇÕES

Foram avaliados peso médio vivo, ganho de peso diário, lesões e alterações intestinais microscópicas.

5.6.1 Peso médio vivo

As aves foram pesadas coletivamente aos 7, 14, 21, 28, 35 e 38 dias. O valor obtido foi dividido pelo número de aves da parcela, obtendo-se o peso médio vivo e expresso em kg.

5.6.2 Ganhos de peso médio diário

Obtido pela relação entre o peso médio da parcela e a idade das aves em dias, sendo expresso em g.

5.6.3 Peso relativo dos órgãos e histomorfometria intestinal

Foram necropsiadas duas (2) aves de cada tratamento no 8º, 10º, 15º, 20º, 30º e 38º dia de vida, às quais foram eutanasiadas pelo método de deslocamento cervical. Foram realizadas coletas e pesagens dos órgãos, em balança digital, das porções dos segmentos intestinais (duodeno, jejunum, íleo e ceco) e fígado duodeno, jejunum, íleo e ceco) e fígado. O peso relativo de cada órgão foi obtido usando a fórmula: peso relativo do órgão = (peso do órgão/peso médio da parcela) x 100. Para a realização das análises histopatológicas, os fragmentos de intestinos (duodeno, jejunum, íleo e ceco) foram coletados e fixados em formol tamponado a 10% e processados. As lâminas com os fragmentos dos órgãos foram coradas com Hematoxilina e Eosina (HE). Para descrição da frequência e gravidade de cada lesão causada por *Clostridium perfringens* foi utilizada a metodologia de Bracarense *et al.* (2012) modificada, na qual os seguintes critérios foram avaliados: características de fusão de vilosidade, achatamento de vilosidade, vacuolização de vilosidade, infiltrado linfocitário, necrose apical de vilosidade, hiperplasia de células caliciformes, edema intersticial, congestão, presença do protozoário *Eimeria* spp (Tabela 3). O escore da lesão foi calculado considerando o grau de severidade (GS) das lesões, que varia entre 0 e 3, sendo o grau 0 sem alteração, grau 1 alteração leve, grau 2 alterações moderadas e grau 3 alterações severas. Para cada alteração observada foi atribuído escores de 0 a 3 conforme a intensidade da lesão, escore 0 sem lesão, escore 1 é de baixa extensão (25%), escore 2 é de média extensão (50%) e escore 3 é de grande extensão (75%). Os valores dos escores foram multiplicados pelo GS, estabelecendo um valor total de alterações visualizadas na mucosa intestinal de cada segmento avaliado.

Tabela 3 - Critérios histológicos utilizados para determinar o escore de lesões intestinais

Tipo de lesão	Fator de severidade	Máximo escore
Fusão de vilosidades	3	39
Achatamento de vilosidades	3	
Vacuolização de enterócitos	6	
Infiltrado linfocítico	6	
Necrose apical de vilosidade	6	
Hiperplasia de células caliciformes	3	
Edema intersticial de vilosidades	3	
Congestão	6	
Protozoário (<i>eimeria acervulina</i>)	3	

Fator de severidade foi calculado multiplicando-se o grau de severidade das lesões (GS) que varia de 0 a 3 e a intensidade das lesões (grau 0, grau 1, grau 2 e grau 3).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Em microscopia de luz (Olympus CX31, Tóquio, Japão), foi realizada a mensuração de 5 vilosidades intactas por seção de cada segmento, da altura (μm), profundidade da cripta (μm) e a proporção vilo:cripta. A altura das vilosidades (AV) foi estimada a partir do topo da vilosidade até a junção das criptas das vilosidades, a profundidade da cripta (PC) foi medida como a profundidade da invaginação das vilosidades e calculou-se a razão entre a altura da vilosidade e a profundidade da cripta (AV/PC).

Figura 5 - Histomorfometria do intestino com a mensuração de 5 vilosidades por seção de cada segmento, da altura (μm) e profundidade da cripta (μm)



Fonte: Arquivo Pessoal (2023).

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento foi conduzido utilizando um delineamento inteiramente casualizado, com seis tratamentos e cinco repetições, exceto o controle negativo que teve quatro repetições. As análises estatísticas foram realizadas a partir dos dados de todas as unidades experimentais incluídas nos tratamentos estudados, aplicando o teste de normalidade dos dados e análise de variância, utilizando o procedimento GLM do pacote SAS (SAS Institute, 2004). Quando os resultados apresentaram diferença, às médias dos tratamentos foram submetidas ao Teste Tukey, considerando um nível de 5 % de significância.

5.8 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na **tabela 4** pode-se observar que para a variável peso médio vivo das aves aos 21 dias, houve efeito significativo entre os tratamentos ($P<0,05$). O tratamento CPA + CPM apresentou ganho de peso aos 21 dias (959g) em relação ao tratamento CN (859g). Nas demais idades, não houve diferença significativa ($P>0,05$) entre os tratamentos.

Tabela 4 - Peso médio vivo das aves aos 7, 14, 21, 28, 35 e 38 dias

Tratamento	Peso (g)					
	7 dias	14 dias	21 dias	28 dias	35 dias	38 dias
CN	131±4,43	381±18,30	859±46,00 b	1432±121,00	2294±126,00	2404±84,60
CP	127±4,24	379±13,40	915±56,20 ab	1370±133,00	2408±162,00	2506±31,00
CPA	130±7,21	370±23,50	892±42,70 ab	1513±82,60	2244±369,00	2360±380,00
CPM	135±6,34	372±12,10	929±34,40 ab	1313±251,00	2536±166,00	2769±153,00
CPA+CPM	136±3,39	387±35,40	959±36,40 a	1468±290,00	2563±14,10	2792±44,60
Valor de P	0,096	0,753	0,033	0,570	0,236	0,059
CV	4,06	5,96	4,78	13,7	8,94	8,82

*Média seguida de letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de tukey a 5%

P: probabilidade;

CV- Coeficiente de variação (%).

Controle negativo (CN), desafiadas com *Clostridium perfringens* (CP), desafiadas com *Clostridium perfringens e adição de ácido benzoico comercial blend óleos essenciais* (CPA), desafiadas com *Clostridium perfringens enzima muramidase* (CPM) e desafiadas com *Clostridium perfringens e adição de ácido benzoico blend óleos essenciais e enzima muramidase* (CPA+CPM).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Observa-se que no ganho de peso diário aos 21 dias de idade (Tabela 5), houve efeito significativo entre os tratamentos ($P<0,05$), no qual o tratamento CPA + CPM apresentou ganho maior de peso (82,2g) em relação ao tratamento CN (68,3g), entretanto não diferenciando dos demais.

Tabela 5 - Ganco de peso diário (GPD) de frangos de corte

Tratamento	GPD (g) em intervalo de dias			
	1 a 7	7 a 14	14 a 21	28 a 35
CN	12,3±0,63	35,8± 2,82	68,3±7,04 b	123,4±26,70
CP	11,7±0,60	36,0±1,72	76,5±7,82 ab	148,3± 9,73
CPA	12,1±1,03	34,3±3,52	74,4±6,02 ab	104,5±50,00
CPM	12,9±0,90	33,9±1,52	79,5±3,30 ab	174,8± 42,10
CPA+CPM	13,0±0,48	35,9±5,18	82,2± 5,44 a	179,60±55,50
Valor de P	0,096	0,769	0,027	0,076
CV	6,17	9,39	7,97	26,3

*Médias seguidas de letras diferentes nas colunas diferem entre si pelo teste de tukey a 5%.

P: probabilidade;

CV: Coeficiente de variação (%);

Controle negativo (CN), desafiadas com *Clostridium perfringens* (CP), desafiadas com *Clostridium perfringens e adição de ácido benzoico comercial blend óleos essenciais* (CPA), desafiadas com *Clostridium perfringens enzima muramidase* (CPM) e desafiadas com *Clostridium perfringens e adição de ácido benzoico blend óleos essenciais e enzima muramidase* (CPA+CPM).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Aristimunha *et al.* (2016) obtiveram resultados positivos de ganho de peso diário de 1 a 42 dias com dietas utilizando ácido benzoico associado aos óleos essenciais, corroborando com os dados deste trabalho em que o peso médio das aves de 21 dias e o ganho de peso diário de 14-21 dias foram maiores sob efeito do tratamento CPA+CPM (tabela 4 e tabela 5). Buchanan *et al.* (2008) demonstraram que com o uso de aditivos fitogênicos em uma dieta de rendimento máximo não houve diferença estatística no ganho de peso diário. Outros estudos relataram que a suplementação de dietas com ácido benzoico associado a óleos essenciais não influenciaram nos resultados de ganho de peso corporal e ganho de peso diário (Jang, *et al.*, 2007.; Barreto *et al.*, 2008; Hernández, *et al.*, 2004.; Lee *et al.*, 2003). Estudos *in vivo* com frangos de corte desafiados com *Clostridium perfringens* (Liu *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2010) demonstraram que o uso da lisozima dietética muramidase melhora o desempenho de crescimento das aves em comparação com aves de controle desafiadas sem o uso da lisozima, mas não em comparação com aves não desafiadas.

Na **Tabela 6** são apresentados os resultados de peso relativo dos órgãos de frangos de corte aos 8 dias de idade. Verificou-se diferença apenas para a variável peso relativo de duodeno ($P<0,05$), o tratamento CPM apresentou peso maior do órgão (2,78g) em relação ao tratamento CP (1,47g). Apesar de não haver diferença entre os tratamentos no peso vivo aos 7 dias, como visto anteriormente, o peso relativo do duodeno aos 8 dias no tratamento CPM foi maior, quando comparado aos demais tratamentos.

Tabela 6 - Peso relativo dos órgãos de frangos de corte com 8 dias de idade

Trat	Duodeno	Jejuno	Íleo	Ceco	Fígado
CN	2,03±0,40 ab	5,14±1,33	0,60±0,01	0,60±0,01	3,42±0,42
CP	1,47±0,81 b	4,46±0,93	0,61±0,01	0,61±0,01	3,68±0,41
CPA	2,02±0,66 ab	5,50±1,49	0,61±0,02	0,61±0,02	3,60±0,55
CPM	2,78±0,33 a	5,15±1,70	0,59±0,02	0,59±0,02	3,49±0,48
CPA+CPM	2,26±0,28 ab	4,03±1,44	0,57±0,01	0,57±0,01	3,78±0,56
Valor de P	0,026	0,509	0,065	0,065	0,787
CV	25,0	29,3	3,28	3,28	13,7

* Média seguida de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de tukey a 5%.

P: probabilidade

CV: Coeficiente de variação (%);

Controle negativo (CN), desafiadas com *Clostridium perfringens* (CP), desafiadas com *Clostridium perfringens* e adição de ácido benzoico comercial blend óleos essenciais (CPA), desafiadas com *Clostridium perfringens* enzima muramidase (CPM) e desafiadas com *Clostridium perfringens* e adição de ácido benzoico blend óleos essenciais e enzima muramidase (CPA+CPM).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O peso relativo do duodeno aos 8 dias sob efeito da enzima muramidase (Tabela 6) foi maior do que os demais tratamentos. Este aumento do peso relativo do duodeno pode ser explicado pela presença de lesões histopatológicas microscópicas de edema intersticial nas vilosidades grau III de intensidade e severidade grau I e de lesões de infiltrado linfocítico grau III de intensidade e grau I de severidade observado no tratamento CPM, onde tais lesões de caráter inflamatório e de resposta ao hospedeiro podem conferir um aumento do peso relativo do órgão. O protocolo de indução da enterite necrótica *in vivo* influencia na inflamação e na gravidade das lesões intestinais (Bortoluzzi *et al.*, 2019). Cruz-Polycarpo *et al.* (2020) não encontraram diferenças nos pesos relativos e comprimento dos intestinos delgado e grosso com o uso de ácido orgânico na dieta e aves de corte.

Aos 10 dias de idade, houve diferença estatística ($P<0,05$) para a variável peso relativo do fígado, o tratamento CN apresentou média estatisticamente menor do peso relativo (3,49 g), em relação ao tratamento CPA (4,87 g) conforme descrito na Tabela 7.

Tabela 7- Peso relativo dos órgãos de frangos de corte com 10 dias de idade

Tratamento	Duodeno	Jejuno	Íleo	Ceco	Fígado
CN	3,18±0,26	5,92±2,24	0,42±0,01	0,68±0,20	3,49±0,77 b
CP	2,71±0,52	6,70±0,20	0,43±0,01	0,85±0,34	3,46±0,34 ab
CPA	2,81±0,27	6,70±2,44	0,43±0,02	1,28±0,52	4,87±0,85 a
COM	2,61±0,06	6,37±0,88	0,42±0,01	0,98±0,37	4,17±0,32 ab
CPA+CPM	2,72±0,41	6,85±1,05	0,40±0,05	0,98±0,03	4,36±0,83 ab
Valor de P	0,224	0,907	0,056	0,169	0,029
CV	12,6	25,4	3,42	35,8	16,5

* Média seguida de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de tukey a 5%.

P: probabilidade

CV: coeficiente de variação (%);

Controle negativo (CN), desafiadas com *Clostridium perfringens* (CP), desafiadas com *Clostridium perfringens* e adição de ácido benzoico comercial blend óleos essenciais (CPA), desafiadas com *Clostridium perfringens* enzima muramidase (CPM) e desafiadas com *Clostridium perfringens* e adição de ácido benzoico blend óleos essenciais e enzima muramidase (CPA+CPM).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na **tabela 8** são apresentados os dados de peso relativo dos órgãos de frangos aos 15 dias de idade, observando que não houve efeito dos tratamentos sobre peso dos órgãos ($P>0,05$).

Tabela 8 - Peso relativo dos órgãos de frangos de corte com 15 dias de idade

Tratamento	Duodeno	Jejuno	Íleo	Ceco	Fígado
CN	2,23±0,15	5,82±0,24	0,45±0,24	1,21±0,22	2,89±0,10
CP	2,66±0,17	6,88±0,97	0,88±0,23	1,23±0,26	3,73±0,25
CPA	2,62±0,29	6,91±1,44	0,51±0,25	1,20±0,46	3,71±0,67
CPM	2,61±0,20	7,09±0,17	0,73±0,12	1,13±0,19	3,60±0,64
CPA+CPM	2,48±0,165	7,19±0,94	0,78±0,20	1,20±0,47	3,56±0,36
Valor de P	0,055	0,379	0,050	0,993	0,126
CV	8,19	13,6	32,5	28,0	13,7

* Média seguida de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de tukey a 5%

P: probabilidade

CV- Coeficiente de variação (%);

Controle negativo (CN), desafiadas com *Clostridium perfringens* (CP), desafiadas com *Clostridium perfringens* e adição de ácido benzoico comercial blend óleos essenciais (CPA), desafiadas com *Clostridium perfringens* enzima muramidase (CPM) e desafiadas com *Clostridium perfringens* e adição de ácido benzoico blend óleos essenciais e enzima muramidase (CPA+CPM).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados relacionados com o peso relativo dos órgãos aos 20 dias de idade podem ser observados na **tabela 9**. Identificou-se efeito dos tratamentos para a variável de peso relativo do fígado ($P<0,05$), na qual os pesos do fígado das aves que receberam dietas contendo CP (2,50g), apresentaram média menor em relação ao tratamento CPM

(3,08g), podendo estar atribuído com o peso médio vivo aos 21 dias que também foi maior no tratamento .

Tabela 9 - Peso relativo dos órgãos de frangos de corte com 20 dias de idade

Tratamento	Duodeno	Jejuno	Íleo	Ceco	Fígado
CN	1,83±0,19	5,47±0,53	0,63±0,06	1,33±0,24	3,04±0,19 ab
CP	1,65±0,14	4,26±0,52	0,58±0,07	1,23±0,15	2,50±0,284,00 b
CPA	1,84±0,17	5,49±0,72	0,69±0,08	1,13±0,28	2,74±0,23 ab
CPM	1,71±0,03	5,04±0,71	0,60±0,06	1,18±0,26	3,08±0,06 a
CPA+CPM	1,87±0,22	5,53±0,58	0,75±0,16	1,49±0,41	3,00±0,38 ab
Valor de P	0,328	0,053	0,097	0,419	0,032
CV	9,55	12,2	14,5	22,2	9,02

*Médias seguida de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de tukey a 5%.

P: probabilidade

CV- Coeficiente de variação (%);

Controle negativo (CN), desafiadas com *Clostridium perfringens* (CP), desafiadas com *Clostridium perfringens e adição de ácido benzoico comercial blend óleos essenciais* (CPA), desafiadas com *Clostridium perfringens enzima muramidase* (CPM) e desafiadas com *Clostridium perfringens e adição de ácido benzoico blend óleos essenciais e enzima muramidase* (CPA+CPM).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na **tabela 10** são apresentados os pesos relativos dos órgãos de frangos aos 30 dias de idade. Para o peso de ceco, houve efeito significativo dos tratamentos ($P<0,05$), onde o tratamento CP apresentou menor peso (1,00g), em relação ao tratamento CPA + CPM (1,59g). A resposta de peso relativo do fígado também foi afetada pelos tratamentos ($P<0,05$), onde o tratamento CPA + CPM apresentou maior média de peso (4,55g) em relação aos tratamentos CPA, CPM e CP (3,04; 3,36; 2,80g, respectivamente). Não houve diferenças estatísticas ($P>0,05$) entre os tratamentos no duodeno, jejuno e íleo

Tabela 10 - Peso relativo dos órgãos de frangos de corte com 30 dias de idade

Tratamento	Duodeno	Jejuno	Íleo	Ceco	Fígado
CN	1,53±0,18	5,73±1,55	0,62±0,10	1,20±0,20 ab	3,34±0,12 ac
CP	1,36±0,11	3,41±0,49	0,52±0,13	1,00±0,10 b	2,80±0,12 bc
CPA	1,81±0,70	4,29±0,67	0,65±0,07	1,18±0,16 ab	3,04±0,22 bc
CPM	1,86±0,12	3,85±0,50	0,62±0,18	1,39±0,23 ab	3,36±0,65 bc
CPA+CPM	2,17±0,77	5,58±2,25	0,65±0,34	1,59±0,33 a	4,55±0,69 a
Valor de P	0,218	0,050	0,801	0,027	0,006
CV	24,9	24,8	26,1	16,3	13,1

*Médias seguida de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de tukey a 5%.

P: probabilidade

CV- Coeficiente de variação (%);

Controle negativo (CN), desafiadas com *Clostridium perfringens* (CP), desafiadas com *Clostridium perfringens* e adição de ácido benzoico comercial blend óleos essenciais (CPA), desafiadas com *Clostridium perfringens* enzima muramidase (CPM) e desafiadas com *Clostridium perfringens* e adição de ácido benzoico blend óleos essenciais e enzima muramidase (CPA+CPM).

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

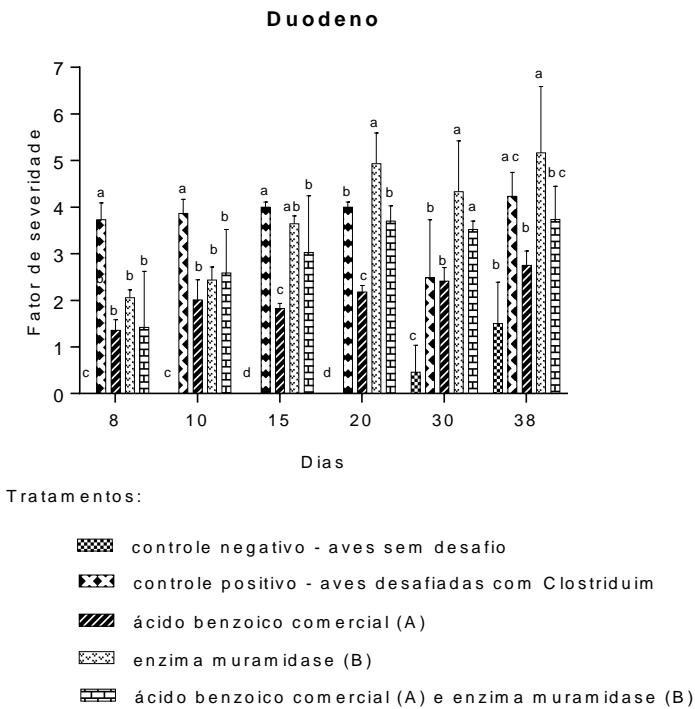
O aumento do peso relativo do fígado (Tabela 10), nos tratamentos CPM e CPA+CPM pode ser explicado pela ação antioxidant das lisozimas que protegem as células hepáticas dos radicais livres, minimizando a toxicidade e protegendo o fígado (Robertson *et al.*, 2016), como consequência há o aumento de peso do órgão. Schliffka *et al.* (2019) em seu trabalho relatam não encontrar diferença do peso relativo do fígado em dietas para suínos, contendo a enzima muramidase. Fascina (2011), relatou que o uso de aditivos fitogênicos associado ao uso de ácidos orgânicos influenciou no peso relativo do intestino, fígado e pâncreas aos 7 dias de idade.

No **gráfico 1** são apresentados os dados de severidade de lesões no duodeno de frangos de corte em diferentes idades. Verificou-se efeito dos tratamentos em todas as idades avaliadas (8, 10, 15, 20, 30 e 38 dias), sendo que o tratamento CN apresentou as menores médias ($P<0,05$) para o fator de severidade. Os tratamentos CPM e CP apresentaram os maiores ($P<0,05$) valores para o fator de severidade, atingindo médias de 5,17 e 4,23, respectivamente. Em todas as fases de vida avaliadas, o tratamento CPA apresentou as menores ($P<0,05$) médias de fator de severidade. Aos 8 dias é possível observar que o peso relativo do duodeno no tratamento CP apresentou a menor média de peso (1,47 g) e apresentou a maior média do fator de severidade (3,73).

No gráfico 1, aos 20, 30 e 38 dias, a média do fator de severidade do tratamento CPM é maior do que a média do fator de severidade do tratamento CP, podendo ser

explicado pela dose utilizada da enzima muramidase de 350g/tonelada, a qual não foi capaz de inibir o aumento dos escores de intensidade e severidade das lesões de fusão de vilosidades, achatamento de vilosidades, infiltrado linfocitário, necrose apical de vilosidade, edema intersticial de vilosidade e congestão, tendo como consequência o aumento da média do fator de severidade. Liu *et al.* (2010) observaram que aos 28 dias há uma diminuição dos escores de lesões intestinais de aves suplementadas com lisozima muramidase (40 mg/kg), indicando que a lisozima melhorou o desempenho e saúde intestinal das aves desafiadas com *Clostridium perfringens*. Zhang *et al.* (2010) demonstraram que houve diminuição dos escores de lesões intestinais em aves desafiadas com *Clostridium perfringens* e *Eimeria maxima*, suplementadas com lisozima muramidase na dose de 200 g/toneladas.

Gráfico 1 - Fator de severidade duodeno aos (8, 10, 15, 20, 30 e 38 dias)

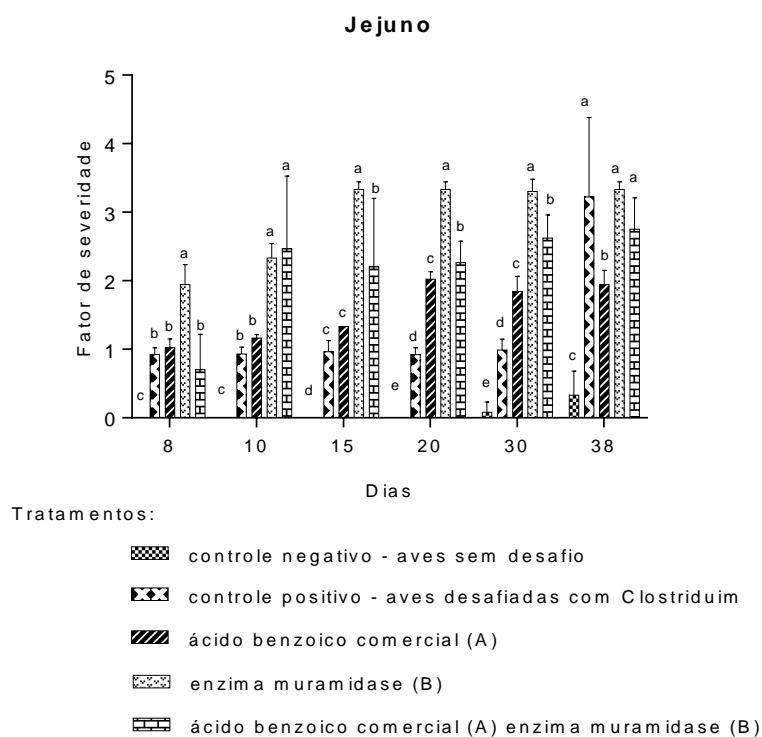


Fonte: Elaborado pela autora (2023).

No **gráfico 2** são apresentados os valores de severidade de lesões verificados no jejuno de frangos de corte em diferentes idades. Nessa porção do intestino delgado, novamente o tratamento CN apresentou as menores médias ($P<0,05$) nas diferentes

idades estudadas, aos 8, 15, 20 e 30 dias. Enquanto que nestas idades, o tratamento CPM apresentou as maiores médias ($P<0,05$) de severidade de lesões e é possível observar que a partir dos 20 dias, o jejuno no tratamento CPM apresenta os menores pesos relativos, associado ao aumento da severidade das lesões intestinais e como consequência há a diminuição do tamanho do órgão. A partir dos 15 dias, os tratamentos CPA, CPM e CPA+CPM apresentaram aumento no escore de severidade das lesões quando comparados com o tratamento CP.

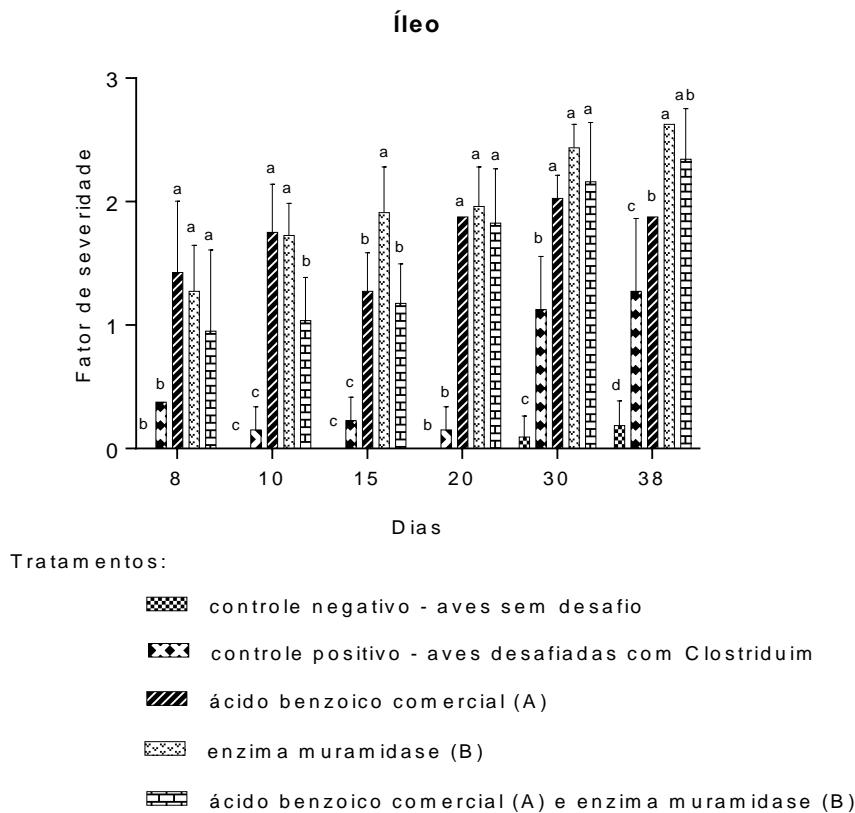
Gráfico 2 - Fator de severidade jejuno aos (8, 10, 15, 20, 30 e 38 dias).



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados do fator de severidade para a porção do íleo são apresentados no **gráfico 3**. Nas idades de 8, 20 e 30 dias, os tratamentos CPA, CPM e CPA + CPM, apresentaram as maiores médias ($P<0,05$) para o fator de severidade. Aos 30 dias de idade o peso relativo do íleo é maior para os tratamentos CPA, CPM e CPA+CPM, demonstrando que apesar de apresentar maiores médias de fator de severidade de lesões, houve um desenvolvimento maior do órgão quando comparado ao controle positivo.

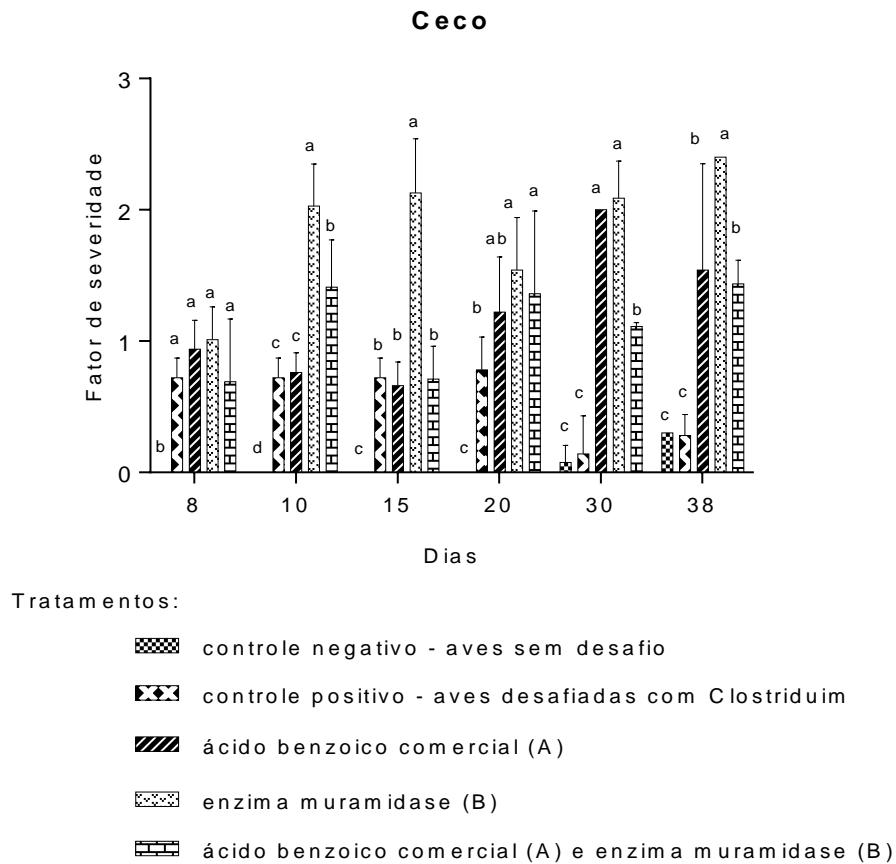
Gráfico 3 - Fator de severidade íleo aos (8, 10, 15, 20, 30 e 38 dias)



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Avaliando o fator de severidade nas porções do intestino grosso (**Gráfico 4**), verificou-se no ceco que os tratamentos influenciaram essa resposta. Nas idades de 8, 10, 15 e 20 dias, o tratamento CN seguiu apresentando as menores médias. Aos 30 e 38 dias esse comportamento foi verificado tanto para o tratamento CN como CP. Em contrapartida as maiores médias foram verificadas para os CPA, CPM, CPA + CPM e CP (8 dias), CPM (10, 15 e 38 dias), CPM e CPA + CPM (20 dias) e CPA e CPM (30 dias).

Gráfico 4 - Fator de severidade ceco aos (8, 10, 15, 20, 30 e 38 dias)



Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados de morfometria de vilosidades do duodeno ($P<0,05$), são apresentados na **tabela 11**, observou-se que as aves que receberam a dieta CN apresentaram maior profundidade da cripta, diferindo do tratamento CPM. Na altura de vilosidades e relação vilo:cripta não houve efeito ($P>0,05$) dos tratamentos.

Tabela 11 - Morfometria do duodeno da cripta e altura do vilo em mm (média ± desvio padrão).

Controle negativo (CN), desafiadas com *Clostridium perfringens* (CP), desafiadas com *Clostridium perfringens e adição de ácido benzoico blend óleos essenciais* (CPA), desafiadas com *Clostridium perfringens enzima muramidase* (CPM) e desafiadas com *Clostridium perfringens e adição de ácido benzoico blend óleos essenciais e enzima muramidase* (CPA+CPM) de frangos de corte abatidos aos 30 dias de idade.

Tratamento	Profundidade cripta	Altura vilo	Relação Vilo:Cripta
CN	218±68,4 a	1474±245	7,45±2,72
CP	209±59,2 ab	1458±338	7,59±2,96
CPA	202± 51,3 ab	1482±267	7,15±1,70
CPM	184±54,8 b	1368±251	7,86±2,40
CPA+CPM	196±55,4 ab	1367±282	7,53±2,61
Valor de P	0,049	0,090	0,759
CV	28,7	19,5	33,5

*Médias seguida de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de tukey a 5%.

P: probabilidade

CV- Coeficiente de variação (%)

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Tabela 12 - Morfometria do jejuno da cripta e altura do vilo em mm (média ± desvio padrão)

Controle negativo (CN), desafiadas com *Clostridium perfringens* (CP), desafiadas com *Clostridium perfringens e adição de ácido benzoico blend óleos essenciais* (CPA), desafiadas com *Clostridium perfringens enzima muramidase* (CPM) e desafiadas com *Clostridium perfringens e adição de ácido benzoico blend óleos essenciais e enzima muramidase* (CPA+CPM) de frangos de corte abatidos aos 30 dias de idade.

Tratamento	prof cripta	Altura vilo	Relação Vilo:Cripta
CN	201±39,00 a	1079±200,00 a	5,30±1,14 c
CP	155±52,30 c	960±186,00 b	6,70±1,85 ab
CPA	128±40,80 c	828±139,00 c	7,13±2,13 ab
CPM	137±56,30 bc	948±217,00 b	7,67±2,44 a
CPA+CPM	164±57,00 b	966±204,00 b	6,04±1,53 bc
Valor de P	<0,0001	<0,0001	<0,0001
CV	32,56	20,09	28,91

*Médias seguida de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de tukey a 5%.

P: probabilidade

CV- Coeficiente de variação (%)

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Na avaliação na porção do jejuno (**tabela 12**), observou-se maior ($P<0,001$) profundidade da cripta e maior altura de vilosidade no tratamento CN, diferindo dos demais, sendo que o tratamento CPA apresentou menor ($P<0,001$) profundidade e menor

altura de vilosidade. Na relação vilo:crypta o tratamento CN apresentou menor ($P<0,001$) relação, diferindo do tratamento CPM.

Na tabela 12, na porção do jejuno foi possível observar que o tratamento com o ácido benzoico associado a óleos essenciais apresentou uma menor profundidade de crypta e uma menor altura de vilosidade, indicando uma piora na qualidade intestinal das aves com uma maior perda energética com taxas de renovação celular. Já na relação vilo:crypta, o tratamento com a enzima muramidase apresentou o maior valor de (7,67), demonstrando que quanto maior a relação vilo:crypta melhor a diferenciação da mucosa intestinal e maiores são o ganho de peso médio vivo e ganho de peso diário (Tabela 4 e 5).

Tabela 13 - Morfometria do íleo da crypta e altura do vilo em mm (média ± desvio padrão)

Controle negativo (CN), desafiadas com *Clostridium perfringens* (CP), desafiadas com *Clostridium perfringens* e adição de ácido benzoico comercial A (CPA), desafiadas com *Clostridium perfringens* enzima muramidase B (CPM) e desafiadas com *Clostridium perfringens* e adição de ácido benzoico comercial A e enzima muramidase B (CPA+CPM) de frangos de corte abatidos aos 30 dias de idade .

Tratamento	Prof crypta	Altura vilo	Relação Vila: Cripta
CN	126±31,90	756±131,00 a	6,20±1,58 a
CP	115±24,10	691±137,00 a	5,92±1,14 ab
CPA	127±33,60	619±103,00 b	4,88±1,17 b
CPM	116±29,60	610±109,00 b	5,32±1,66 ab
CPA+CPM	118±29,80	575±67,80 b	5,16±1,31 b
Valor de P	0,190	<0,0001	0,0003
CV	25,06	17,16	25,67

*Médias seguida de letras diferentes na coluna diferem entre si pelo teste de tukey a 5%.

P: probabilidade

CV- Coeficiente de variação (%)

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Os dados de morfometria do íleo das aves em função dos tratamentos são apresentados na **tabela 13**, não houve efeito na profundidade de crypta ($P>0,05$). Na altura de vilosidades observou- se que os tratamentos CP e CN apresentaram maior ($P<0,001$) altura diferindo dos demais tratamentos. Na relação vilo:crypta os tratamentos CPA e CPA+CPM apresentaram menor ($P<0,001$) relação diferindo significativamente do tratamento CN.

Nos dados de morfometria do íleo (Tabela 13), não foi possível observar melhora na qualidade intestinal, profundidade de cripta e altura de vilosidade e na relação vilo:cripta sob efeitos dos tratamentos utilizados. Já Goodarzi Boroojeni *et al.* (2019), encontraram um aumento no comprimento do vilo ileal até a cripta em razão da profundidade com a utilização da enzima muramidase. Amer *et al.* (2023) observaram que em dietas suplementadas com 200 e 400 mg/kg⁻¹ de muramidase foi possível observar aumento na altura das vilosidades duodenais e aumento da profundidade de cripta ileal. A altura da vilosidade jejunal foi maior no grupo suplementado com 400 mg/kg⁻¹. A relação Vilo:Cripta foi maior no grupo suplementado com 400 mg/kg⁻¹ no duodeno, nos grupos 200 mg/kg⁻¹ e 400 mg/kg⁻¹ no jejuno e nos grupos 400 mg/kg⁻¹ e 600 mg/kg⁻¹ no íleo.

5.9 CONCLUSÃO

O ácido benzoico associado a óleos essenciais e a enzima muramidase influenciariam positivamente sobre o peso médio das aves aos 21 dias e sobre o ganho de peso médio diário entre 14-21 dias em aves desafiadas com *Clostridium perfringens*. Na porção do jejuno a enzima muramidase influenciou positivamente sobre a diferenciação da mucosa intestinal e um maior ganho de peso médio vivo e ganho de peso diário foi observado aos 35 e 38 dias.

O ácido benzoico associado a óleos essenciais e enzima muramidase aumentam ganho de peso médio e o ganho de peso médio diário das aves, além de diminuir a intensidade e severidade das lesões intestinais causadas pelo *Clostridium perfringens*.

REFERÊNCIAS

AMER, S.A.; FARAHAT, M.; GOUDA, A.; AHMED, A.A. ABDEL-WARETH.; ABDEL-WAHAB. A.; YOUNIS, E.M.; ELSHOPAKEY, G.E.; BAHER, W.M.; SALEH, G.K.; DAVIES, S.J.; ATTIA, G.A. New Insights into the effects of microbial Muramidase addition in the diets of broiler chickens. *Animals*, v.13, n. 8, 1356, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani13081356>

ARISTIMUNHA, P.C.; ROSA, A.P.; BOEMO, L.S.; GARCEZ, D.C.; ROSA, D.P.; LONDERO, A.; SCHER, A.; FORGIARINIY, J. A blend of benzoic acid and essential oil compounds as an alternative to antibiotic growth promoters in broiler diets. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 25, n. 4, p. 455-463, Dec. 2016. DOI: <https://doi.org/10.3382/japr/pfw015>

AVIAGEM. **Frango de corte**: manual de manejo. Huntsville: Aviagem, 2018. E-book. Disponível em: https://pt.aviagen.com/assets/Tech_Center/BB_Foreign_Language_Docs/Portuguese/ROss-BroilerHandbook2018-PT.pdf. Acesso em: 01 abr. 2023.

BARRETO, M.S.R.; MENTEN, J.F.M.; RACANICCI, A.M.C.; PEREIRA, P.W.Z.; RIZZO, P.V. Plant extracts used as growth promoter in broilers. *Revista Brasileira de Ciência Avícola*, v.10, n.2, p.109-115, 2008.

BORTOLUZZI, C.; VIEIRA, B. S.; HOFACRE, C.; APPEGATE, T. J. Effect of Different Challenge Models to Induce Necrotic Enteritis on the Growth Performance and Intestinal Microbiota of Broiler Chickens. *Poultry Science*, v. 98, n. 7, p.2800–2812, 2019. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pez084>

BUCHANAN, N.P. HOTT, J.M.; CUTLIP, S.E.; RACK, A.L. ASAMER, A.; MORITZ, J.S. The Effects of a Natural Antibiotic Alternative and a Natural Growth Promoter Feed Additive on Broiler Performance and Carcass Quality. *Journal of Applied Poultry Research*, v. 17, n. 2, p. 202-210, Jul. 2008. DOI: <https://doi.org/10.3382/japr.2007-00038>

CRUZ-POLYCARPO, V. C.; FRESCHE, J. B.; POLYCARPO, G. V.; ARAUJO, R. G. A. C.; BARBIERI, A.; SOUSA, R. L. M. Isolated and combined organic acids in diets of broiler chickens challenged with *Eimeria acervulina*. *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 72, n. 4, p. 1511-1521, ago. 2020. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/1678-4162-11647>.

DAI, D.; QIU, K.; ZHANG, H.; WU, S.; HAN, Y.; WU, Y.; QI, G.; WANG, J. Organic Acids as Alternatives for Antibiotic Growth Promoters Alter the Intestinal Structure and Microbiota and Improve the Growth Performance in Broilers. *Frontiers in Microbiology*, v. 11, 14 jan. 2021. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.618144>

FASCINA, V. B. **Aditivos fitogênicos e ácidos orgânicos em dietas de frango de corte.** 2011. Tese (Doutorado em Zootecnia) – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2011.

GOODARZI BOROOJENI, F.; MANNER, K.; RIEGER, J.; PÉREZ CALVO, E.; ZENTEK, J. Evaluation of a microbial muramidase supplementation on growth performance, apparent ileal digestibility, and intestinal histology of broiler chickens. **Poultry Science**, v. 98, n.5, p. 2080–2086, May 2019. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pey556>

HERNÁNDEZ, F.; MADRID, J.; GARCÍA, V.; ORENGO, J.; MEGÍAS, M. D. Influence of two plant extracts on broilers performance, digestibility, and digestive organ size. **Poultry Science**, v. 83, n. 1, p.169-174, Feb. 2004. DOI: <https://doi.org/10.1093/ps/83.2.169>

IMMERSEEL, F. V.; ROODM, I.; MOORE, R.J.; TITBALL, R.W. Rethinking our understanding of the pathogenesis of necrotic enteritis in chickens. **Trends in Microbiology**, v.17, n. 1, p.32-36, Jan. 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tim.2008.09.005>

JANG, I. S.; KO, Y. H.; KANG, S. Y.; LEE, C. Y. Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology** , v. 134, n. 3-4, p. 304-315, Apr. 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2006.06.009>

LEE, K.W.; EVERTS, H.; KAPPERT, H.J.; FREHNER, M.; ROSA, R.; BEYNEN, A.C. Effects of dietary essencial oil components on growth performance, digestive enzymes and lipid metabolism in female broiler chickens. **British Poultry Science**, v.44, n.3, p.450-457, Jul. 2003. DOI: <https://doi.org/10.1080/0007166031000085508>.

LICHTENBERG, J.; PEREZ CALVO, E.; MADSEN, K.; OSTERGAARD LUND, T.; KRAMER BIRKVED, F.; VAN CAUWENBERGHE, S.; MOURIER, M.; WULFANDERSEN, L.; JANSMAN, A.J.M.; LOPEZ-ULIBARRI. Safety evaluation of a novel muramidase for feed application. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 89, p. 57–69, Oct. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.yrtph.2017.07.014>

LIU, D.; GUO, Y.; WANG, Z.; YUAN, J. Exogenous lysozyme influences *Clostridium perfringens* colonization and intestinal barrier function in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 39, n.1, p.17.24, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079450903447404>

LIU, Y.; ESPINOSA, C. D.; ABELILLA, J. J.; CASAS, G. A.; LAGOS, L. V.; LEE, S. A.; KWON, W. B.; MATHAI, J. K.; NAVARRO, D. M. D. L.; JAWORSKI, N. W.; STEIN, H. H. Non-antibiotic feed additives in diets for pigs: A review. **Animal Nutrition**, v. 4, n. 2, p. 113–125, Jun. 2018. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.aninu.2018.01.007>

LONG, Y.; LIN, S.; ZHU, J.; PANG.X.; FANG, Z.; LIN, Y.; CHE, L.; XU, S.; LI, J.; HUANG, Y.; SU, X.; WU, D. Effect of dietary lysozyme levels on growth performance, intestinal morphology, non-specific immunity and mRNA expression in weanling piglets. **Anim. Scie**, n.87, v.3, p. 411-418, Mar. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/asj.12444>

MACARI, M.; FURLAN R. L.; GONZALES, E. (ed.). **Fisiologia aviária aplicada a frangos de corte**. 2 ed. Jaboticabal: FUNEP-UNESP, 2002

MAY, K.D.; WELLS, J. E.; MAXWELL, C. V.; OLIVER, W. T. Granulated lysozyme as an alterantive to antibiotics improves growth performance and small intestinal morphology of 10-day-old pigs. **Journal Animal Science**, v. 90, n. 4, p.118-1125, Apr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2011-4297>

MURUGESAN, G.R.; SYED, B.; HALDAR, S.; PENDER, C. Phytogenic feed aditives as na alternative to antibiotic growth promoters in broiler chickens. **Frontiers in Veterinary Science**, v.2, n. 21, Aug. 2015.

NASERI, K. G.; RAHIMI, S.; KHAKI, P. Comparison of the effects of probiotic, organic acid and medicinal plant on Campylobacter jejuni challenged broiler chickens. **Journal Agriculture Science Technology**, v.14, p.1485–1496, 2012.

OLIVER, W. T.; WELLS, J. E.; MAXWELL, C. V. Lysozyme as an alternative to antibiotics improves performance in nursery pigs during an indirect immune challenge. **Journal Of Animal Science**, v. 92, n. 11, p. 4927-4934, 1 Nov. 2014. DOI: <http://doi.org/10.2527/jas.2014-8033>

OLIVER, W.T.; WELL, J.E. Lysozyme as na alternative to antibiotics improves growth performance and small intestinal morphology in nursery pigs. **Journal Animal Science**, v. 91, n. 7, p.3129-3136, 2013. DOI: <https://doi.org/10.2527/jas.2012-5782>

ROBERTSON, F.P; BESSEL, P; R; DIAZ-NIETO, R; THOMAS, N; ROLANDO, N; FULLER, B; DAVIDSON, B.R. High serum aspartate tran aminase levels on day 3 postliver transplantation correlates with graft and patient survival and would be a valid surrogate for outcome in liver transplantation clinical trials. **Transplant International**, v. 29, n. 3, p. 323-330, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1111/tri.12723>

RODRIGUES, L. M.; LIMA NETO, T.O.A.; GARBOSSA, C. A. P.; MARTINS, C. C. S.; GARCEZ, D.; ALVES, L.K.S.; ABREU, M.L.T.; FERREIRA, R.A.; CANTARELLI, V.S.; Benzoic acid combined with essencial oils can be na alternative to the use of antibiotic growth promoters for piglets challenged with E.coli F4. **Animals**, v.10, n. 11, 1978, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10111978>

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; HANNAS, M. I. *et al.* **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2017.

SAS Institute. **Statistical Analysis Software (SAS)**. Cary, 2004.

SCHLIFFKA, W.; ZHAI, HENG-XIAO.; CALVO, E. P.; VAN CAUWENBERGHE, S.; WALSH, M.; LOPEZ-ULIBARRI, R. Safety and efficacy evaluation of a novel dietary muramidase for swine. **Heliyon**, v .5, n. 10, Oct. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2019.e02600>

SCHOCHEN-ITURRINO, R. P.; URBANO, T.; TROVÓ, K. V. P.; TREMILIOSI NETO, A.; MEDEIROS, A.; ISHI, M.; PAULILLO, A.C.; CARNEIRO, A.P.M. Uso de probióticos para frangos de corte: avaliação do desempenho zootécnico em aves desafiadas com *Clostridium perfringens*. **Ars Veterinária**, v.20, n.3, p.249-255, 2004.

SHAHIDI, S.; MAZIAR, Y.; DELARAM, N. Z. Influence of Dietary Organic Acids Supplementation on Reproductive Performance of Freshwater Angelfish (*Pterophyllum scalare*). **Global Veterinaria**, v. 13, n. 3, p. 373–377, 2014. DOI: 10.5829/idosi.gv.2014.13.03.84297

SUIRYANRAYNA, M. V.; RAMANA, J. V. A review of the effects of dietary organic acids fed to swine. **Journal Of Animal Science And Biotechnology**, v. 6, n. 1, Oct. 2015. DOI: <http://doi.org/10.1186/s40104-015-0042-z>

THOMPSON, J. L.; HINTON, M. Antibacterial activity of formic and propionic acids in the diet of hens on salmonellas in the crop. **British Poultry Science**, v. 38, n. 1, p. 59-65, Mar. 1997. DOI: <http://doi.org/10.1080/00071669708417941>

TIMBERMONT, L.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R; VAN IMMERSEEL, F. Necrotic enteritis in broilers : an updated review on the pathogenesis. **Avian Pathology**, v. 40, n. 4, p. 341-347, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079457.2011.590967>

VAN IMMERSEEL, F.; RUSSELL, J. B.; FLYTHE, M. D.; GANTOIS, I.; TIMBERMONT, L.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.. The use of organic acids to combat Salmonella in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. **Avian Pathology**, v. 35, n. 3, p. 182-188, Jun. 2006. DOI: <http://doi.org/10.1080/03079450600711045>.

WANG, J. P.; YOO, J. S.; LEE, J. H.; ZHOU, T. X.; JANG, H. D.; KIM, H. J.; KIM, I. H. Effects of phenyllactic acid on production performance, egg quality parameters, and blood characteristics in laying hens. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 18, n. 2, p. 203–209, 2009. DOI: <https://doi.org/10.3382/japr.2008-00071>

WENK, C. Herbs and Botanicals as Feed Additives in Monogastric Animals. **Asian-Australasian Journal Of Animal Sciences**, v. 16, n. 2, p. 282-289, 1 jan. 2003. DOI: <http://doi.org/10.5713/ajas.2003.282>

ZHAI, H.; LUO, Y.; REN, W.; SCHYNS, G.; GUGGENBUHL, P. The effects of benzoic acid and essential oils on growth performance, nutrient digestibility, and colonic microbiota in nursery pigs. **Animal Feed Science and Technology**, v. 262, 114426, Apr. 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.114426>

ZHANG, G.; MATHIS, G. F.; HOFACRE, C. L.; YAGHMAEE, P.; HOLLEY, R. A.; DURANCE, T. D. Effect of a radiant energy – treated lysozyme antimicrobial on the control of clostridial necrotic enteritis in broiler chickens. **Avian Diseases**, v. 54, n. 4, p. 1298-1300, Dec. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1637/9370-041410-ResNote.1>

6 AVALIAÇÃO DA INIBIÇÃO DO CRESCIMENTO *IN VITRO* DE *CLOSTRIDIUM PERFRINGENS* FRENTE AOS ADITIVOS ÁCIDO BENZOICO BLEND ÓLEOS ESSENCIAIS E ENZIMA MURAMIDASE

6.1 RESUMO

Devido à uma crescente preocupação com a saúde pública, pelo aparecimento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos e transmissão da resistência aos humanos, pela utilização por muitos anos, na cadeia avícola, de antibióticos promotores de crescimento (APCs), com objetivo de reduzir os problemas sanitários, diferentes aditivos alimentares, probióticos, prebióticos, simbióticos, extratos de plantas, óleos essências, ácidos orgânicos, enzimas dentre outros, tem sido utilizado em substituição ao uso de APCs. Objetivou-se através deste trabalho para a cepa isolada de campo de *Clostridium perfringens*, detectar os genes que codificavam as toxinas e de fatores de virulência, avaliar o perfil de sensibilidade frente aos antimicrobianos de uso na medicina veterinária e testar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) para o ácido benzoico associado a óleos essenciais e a enzima muramidase. A cepa de *Clostridium perfringens*, isolada de campo, foi submetida à extração térmica de DNA e em seguida ao protocolo de PCR para detecção dos genes que codificam as principais toxinas produzidas pelo *Clostridium Perfringens*, alfa (cpa), beta (cpb), epsilon (etx), iota (ia), além de beta- 2 (cpb-2) e enterotoxina (cpe). Utilizou-se também, protocolos para detecção de fatores de virulência adicionais, com genes codificadores de NetB e NetE, NetF e NetG. Como controle, utilizou-se as seguintes cepas de *Clostridium perfringens*: BAA1481 (cpa+, ia+), ATCC 3626 (cpa+, cpb+, etx+, cpb2+ e pfoA+), D7 (cpe+, netE+, netF+, netG+) e CP 149 (netB+). A estirpe de *Clostridium perfringens* previamente isolada e ativada, foi submetida ao teste de sensibilidade antimicrobiana pela técnica de difusão em disco para o antimicrobianos: Amoxicilina (10 µg); Lincomicina (2 µg); Lincomicina + Espectinomicina (109 µg); Neomicina Oxitetraciclina (30 µg); Sulfaclorpiridazina + Trimetoprin (1,25 µg + 23,75 µg); Sulfonamida (300 µg); Tetraciclina (30 µg). A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada para o ácido benzoico associado a óleos essências e a enzima muramidase frente a cepa de *Clostridium perfringens*. Através da tipificação toxigênica pela PCR múltipla, foi demonstrado que a cepa isolada de campo de *Clostridium perfringens* foi do tipo A, com a amplificação da o gene alfa toxina (cpa). Pelo teste de

sensibilidade aos antimicrobianos, pode-se observar que a cepa apresentou resistência à mais de um princípio ativo, Sulfaclorpiridazina + Trimetoprima, Sulfonamidas e Neomicina. No teste *in vitro*, determinou-se a Concentração Inibitória Mínima (CIM) do ácido benzoico associado a óleos essenciais e da enzima muramidase, para a cepa de *Clostridium perfringens*, nas diluições de 8 µg/ml e 64 µg/ml respectivamente. Conclui-se que o gene alfa toxina (cpa) detectado é um dos principais fatores de virulência, a cepa isolada apresenta uma resistência múltipla aos antimicrobianos testados e a determinação *in vitro* da Concentração Inibitória Mínima (CIM) é determinante para adição em dietas de frangos de corte, em substituição aos antibióticos promotores de crescimento para garantir o desempenho zootécnico e saúde dos animais.

Palavras-chave: Antibióticos promotores de crescimento; *Clostridium perfrigens*; Concentração Inibitória Mínima; Fatores de virulência; Resistência bacteriana.

6.2 ABSTRACT

Due to a growing concern about public health, the emergence of microorganisms resistant to antimicrobials and the transmission of resistance to humans, the use for many years, in the poultry chain, of antibiotic growth promoters (AGPs), in order to reduce problems sanitary products, different food additives, probiotics, prebiotics, synbiotics, plant extracts, essential oils, organic acids, enzymes, among others, have been used to replace the use of AGPs. The objective of this work was to isolate the field strain of *Clostridium perfringens*, detect the genes that encode toxins and virulence factors, evaluate the sensitivity profile against antimicrobials used in veterinary medicine and test the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) for benzoic acid associated with essential oils and the muramidase enzyme. The *Clostridium perfringens* field isolate strain was subjected to thermal DNA extraction followed by the PCR protocol to detect the genes that encode the main toxins produced of *Clostridium Perfringens*, alpha (cpa), beta (cpb), epsilon (etx), iota (ia), in addition to beta-2 (cpb-2) and enterotoxin (cpe). Protocols were also used to detect additional virulence factors, with genes encoding NetB and NetE, NetF and NetG. As a control, the following strains of *Clostridium perfringens* were used: BAA1481 (cpa+, ia+), ATCC 3626 (cpa+, cpb+, etx+, cpb2+ and pfoA+), D7 cpe+, netE+, netF+, netG+) and CP 149 (netB+). The previously isolated and activated strain of *Clostridium perfringens* was subjected to antimicrobial susceptibility testing using the disk diffusion technique for the following antimicrobials: Amoxicillin (10 µg); Lincomycin (2 µg); Lincomycin + Spectinomycin (109 µg); Neomycin Oxytetracycline (30 µg); Sulfachlorpyridazine + Trimethoprin (1.25 µg + 23.75 µg); Sulfonamide (300 µg); Tetracycline (30 µg). The Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined for benzoic acid associated with essential oils and the muramidase enzyme against a field isolated strain of *Clostridium perfringens*. Through toxigenic typing by multiple PCR, it was demonstrated that the field isolated strain of *Clostridium perfringens* was type A, with amplification of the alpha toxin gene (cpa). Through the antimicrobial sensitivity test, it can be seen that the strain showed resistance to more than one antibiotic, Sulfachlorpyridazine + Trimethoprim, Sulfonamides and Neomycin. In the *in vitro* test, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of benzoic acid associated with essential oils and the muramidase enzyme was determined for the *Clostridium perfringens* strain, at dilutions of 8 µg/ml and 64 µg/ml respectively. With the results it is concluded that the alpha toxin gene

(cpa) detected is one of the main virulence factors produced of *Clostridium perfringens*, the isolated strain presents multiple resistance to the antimicrobials tested and the in vitro determination of the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) is determinants for addition to broiler diets, replacing antibiotic growth promoters to guarantee the zootechnical performance and health of the animals.

Keywords: Antibiotic growth promoters; Bacterial resistance; *Clostridium perfrigens*; Minimum Inhibitory Concentration; Virulence factors.

6.3 INTRODUÇÃO

A enterite necrótica (EN) é uma doença multifatorial, causada pelo *Clostridium perfringens*, bactéria formadora de esporos, anaeróbica, gram-positiva, virulenta e produtora de toxinas (Gaucher *et al.*, 2015; Songer *et al.*, 1996). As cepas de *Clostridium perfringens* produzem diversos tipos de toxinas, as quais foram divididas em tipos A-G com base na presença de genes que codificam para as toxinas: alfa (CPA), beta (CPB), epsilon (ETX), iota (ITX), NetB e CPE (Rood *et al.*, 2018). EN, causada principalmente pelo tipo A, leva a perdas económicas significativas para a avicultura global (Keyburn, 2015; Wade *et al.*, 2015). Uma série de fatores são predisponentes para aumentar a proliferação de *Clostridium perfringens* e a produção de toxinas, como a composição da dieta, imunossupressão e coccidiose (Williams, 2005). Os casos de EN subclínicos, causam inúmeros prejuízos financeiros devido ao baixo desempenho das aves, ocasionado por danos epiteliais leves o que resulta em diminuição da absorção de nutrientes (Gholamiandehkordi *et al.*, 2007). A variação na produção das toxinas está relacionada ao esquema de toxinotipagem que classifica o *C. perfringens* em sete grupos (A-G), de acordo com a produção de seis dessas toxinas: alfa (CPA), beta (CPB), épsilon (ETX), iota (ITX), enterotoxina (CPE) e NetB (Gohari *et al.*, 2021; Rood *et al.*, 2018).

Há uma crescente preocupação com a saúde pública, devido ao aparecimento de micro-organismos resistentes aos antimicrobianos e transmissão da resistência aos humanos, pela utilização por muitos anos, na cadeia avícola, de antibióticos promotores de crescimento (APCs), com objetivo de reduzir os problemas sanitários (Diarra; Malouin, 2014). Diferentes aditivos alimentares, probióticos, prebióticos, simbióticos, extratos de plantas, óleos essências, ácidos orgânicos, enzimas dentre outros, tem sido utilizados em substituição ao uso de APCs (Reda *et al.*, 2020; Sheiha *et al.*, 2020).

Portanto, este estudo teve como objetivo avaliar o perfil de sensibilidade da estirpe de *Clostridium perfringens* frente aos antimicrobianos de uso na medicina veterinária e determinar a concentração inibitória mínima (MIC) do ácido benzoico associado a óleos essenciais e da enzima muramidase frente à estirpe de *Clostridium perfringens*.

6.4 MATERIAL E MÉTODOS

6.4.1 Detecção dos genes que codificam as toxinas e os fatores de virulência da cepa isolada de campo de *Clostridium perfringens*

A metodologia de caracterização da cepa do isolado de campo de *Clostridium perfringens*, previamente armazenado em freezer-70 no laboratório de Saúde Animal (Empresa Privada A) foi realizada de acordo com Ramos *et al.* (2019), na qual a amostra, foi semeada em ágar SPS (Perfringens Selective Agar) e incubada anaerobicamente a $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Após o crescimento, três colônias arredondadas, redutoras de sulfito, foram submetidas à extração térmica de DNA (Baums *et al.*, 2004) e em seguida ao protocolo de PCR para detecção dos genes que codificam as principais toxinas produzidas pelo *Clostridium Perfringens*, alfa (cpa), beta (cpb), epsilon (etx), iota (ia), além de beta- 2 (cpb-2) e enterotoxina (cpe) (Uzal *et al.*, 2015). Utilizou-se também, protocolos para detecção de fatores de virulência adicionais, com genes codificadores de NetB e NetE, NetF e NetG. Como controle, utilizou-se as seguintes cepas de *Clostridium perfringens*: BAA1481 (cpa+, ia+), ATCC 3626 (cpa+, cpb+, etx+, cpb2+ e pfoA+), D7 cpe+, netE+, netF+, netG+) e CP 149 (netB+).

Tabela 14 - Oligonucleotídeos iniciadores (primers), utilizados para a detecção dos genes que codificam as toxinas e os fatores de virulência adicionais na cepa isolada de campo de

gene	Sequência 5' - 3'	Amplificação	Referência
<i>Cpa</i>	F- GCTAATGTTACTGCCGTTGA R- CCTCTGATACATCGTGTAAAG	324 pb	VIEIRA <i>et al.</i> (2008)
<i>Cpb</i>	F- GCGAATATGCTGAATCATCTA R- GCAGGAACATTAGTATATCTT	196 pb	VIEIRA <i>et al.</i> (2008)
<i>EtX</i>	F- GCGGTGATATCCATCTATTTC R- CCACTTACTTGTCTACTAAC	655 pb	VIEIRA <i>et al.</i> (2008)
<i>Ia</i>	F- ACTACTCTCAGACAAGACAG R- CTTTCCTATTACTATACG	298 pb	VIEIRA <i>et al.</i> (2008)
<i>Cpb-2</i>	F- ACTACTCTCAGACAAGACAG R- CTTTCCTATTACTATACG	573 pb	VIEIRA <i>et al.</i> (2008)

Cpe	F- GGAGATGGTTGGATATTAGG R- GGACCAGCAGTTGTAGATA	233 pb	VIEIRA <i>et al.</i> (2008)
NetB	F- GCTGGTGCTGGAATAATGC R- TCGCCATTGAGTAGTTCCC	563 pb	KEYBURN <i>et al.</i> (2008) PMCID: PMC2233674
NetE	F- TAGAAAACGTTCAATTGTATGG R- AGAAAGCGCTGATACAGCTAATAAA	601 pb	GOHARI <i>et al.</i> (2015). PMCID: PMC4390311
NetF	F- AACAAATATGTACAGGTATAACT R- TTGATAGGTATAATATGGTTCT	862 pb	GOHARI <i>et al.</i> (2015). PMCID: PMC4390311
Net G	F- TTGTTCAGGATTAGTAGCATT R- CATGAGTTGCATAAGTTGGTGT	860 pb	GOHARI <i>et al.</i> (2015). PMCID: PMC4390311

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

6.4.2 Perfil de sensibilidade da estirpe de *Clostridium perfringens* frente aos antimicrobianos

6.4.2.1 Antibiograma

A estirpe de *Clostridium perfringens* previamente isolada e ativada, foi submetida ao teste de sensibilidade antimicrobiana pela técnica de difusão em disco descrita por Bauer *et al.* (1966). Os antibióticos foram selecionados de acordo com base no uso na medicina veterinária. Suspendeu-se uma alçada das colônias em um tubo com solução salina (0,85%), comparando-se o grau de turvamento do tubo com o grau 0,5 da escala de Mac Farland, resultando em uma suspensão na concentração de 10^8 UFC/ml. Em seguida, com o auxílio de um swab, a solução foi semeada na superfície de placas de Petri com Ágar Sangue, sendo inseridos após, os discos de antimicrobianos: Amoxicilina (10 μ g); Lincomicina (2 μ g); Lincomicina + Espectinomicina (109 μ g); Neomicina Oxitetraciclina (30 μ g); Sulfaclorpiridazina + Trimetoprín (1,25 μ g + 23,75 μ g); Sulfonamida (300 μ g); Tetraciclina (30 μ g). As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 42°C por 24 horas, em jarra de anaerobiose, a leitura dos halos de inibição de crescimento foi realizada comparando com as tabelas de referência do CLSI (2023).

6.4.3 Concentração Inibitória mínima (CIM) do ácido benzoico associado a óleos essenciais frente a cepa de *Clostridium perfringens*

Manteve-se às culturas puras (estoques) de *Clostridium Perfringens*. Repicou-se em placas de ágar em meio de cultura TSC (Agar Tryptose-Sulfato Cicloserina). As placas foram colocadas dentro de jarras de anaerobiose, em seguida introduziu-se o gerador de anaerobiose e incubou-se em temperatura de 42 °C por 24 h. As suspensões foram preparadas com solução salina a 0,85 %, ajustando a turbidez da cultura em crescimento com o tubo nº 0,5 da escala de MacFarland (suspensão que contém aproximadamente 10^8 UFC/ml). Dilui-se 100 µl do inóculo inicial em 10 ml de caldo Muller Hinton Cátion ajustado (suspensão de aproximadamente 10^5 UFC/ml). Utilizou-se o volume de acordo com o padrão CLSI, pesou-se 200 mg de ácido benzoico associado a óleos essenciais e dilui-se em 39 ml do diluente DMSO.

Preencheu-se todos os poços da placa de 96 poços (exceto os de controle do ácido orgânico e do inóculo de *Clostridium perfringens*), com 100 microlitros de caldo Mueller Hinton. Adicionou-se 100 microlitros da diluição do ácido benzoico associado a óleos essenciais nos poços A1, C1, E1 e G1 e também nos poços de controle ácido orgânico. Procedeu-se com as diluições do produto testado da seguinte forma: a. Homogeneizou-se os primeiros poços A1, C1, E1 e G1 e passou-se 100 microlitros para os poços seguintes A2, C2, E2 e G2; b. Homogeneizou-se os poços e transferiu-se 100 microlitros para os poços seguintes até chegar aos poços B6, D6, F6 e H6. 4. Adicionou-se 100 microlitros do inóculo de *Clostridium perfringens* em todos os poços exceto os de controle do meio de cultivo e o controle do ácido benzoico associado a óleos essenciais.

Figura 6 - Microplaca de diluição e seus respectivos poços com replicata das amostras, controle do inóculo, controle do meio e controle do ácido benzoico associado a óleos essenciais

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
B	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
C	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
D	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
E	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
F	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
G	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●
H	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●	●

Legenda: ● Controle do meio; ● Controle do ácido benzoico associado a óleos essenciais ● Controle do inóculo; ● Poços que deverão ser preenchidos com 100 microlitros de Muller Hinton caldo, em seguida realizada a diluição do ácido benzoico associado a óleos essenciais e por último adicionado o inóculo de *Clostridium perfringens*

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

A concentração inibitória mínima foi definida como a concentração mais baixa de ácido orgânico inibiu o crescimento visível das bactérias, após incubação de 24 horas a 42°C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

6.4.4 Concentração Inibitória Mínima (CIM) da enzima muramidase frente a cepa de *Clostridium perfringens*

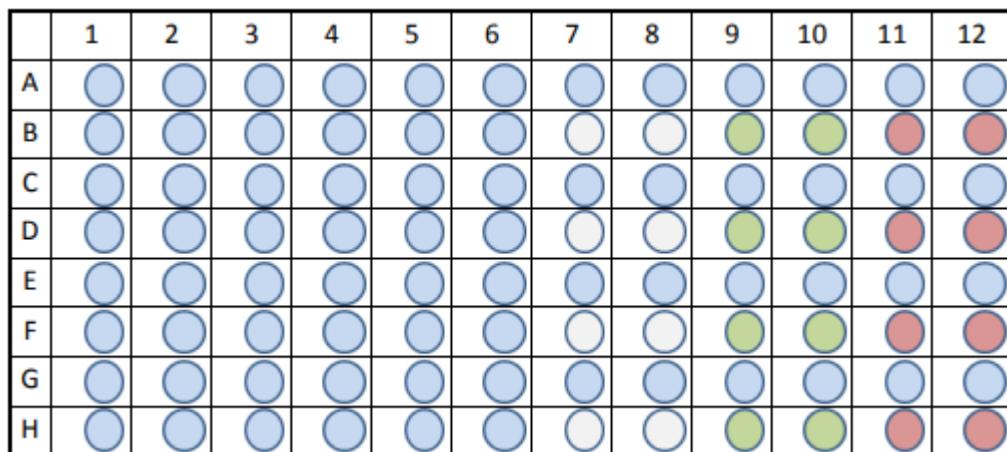
A amostra de *Clostridium Perfringens* foi repicada em placas contendo ágar TSC. As placas foram colocadas dentro de jarras de anaerobiose e incubadas à uma temperatura de 42°C por 24 horas. Em seguida, as suspensões foram ajustadas com solução salina de 0,85% para obter uma turbidez 0,5 da escala de MacFarland (suspensão que contém aproximadamente 10⁸ UFC/ml). 100 µl da amostra foi diluída em 10 ml de caldo Muller Hinton Cátion ajustado (suspensão de aproximadamente 10⁵ UFC/ml) para extração da enzima, de acordo com a metodologia do fabricante da enzima muramidase (DSM). Dilui-se 1g da enzima muramidase em 10 ml de solução

tampão em pH 5, agitando-se por um período de 60 minutos, após a agitação, o sobrenadante foi removido.

Preencheu-se todos os poços da placa de 96 poços (exceto os de controle da enzima muramidase e do inóculo de *Clostridium perfringens*), com 100 microlitros de caldo Mueller Hinton. Adicionou-se 100 microlitros da diluição da enzima muramidase nos poços A1, C1, E1 e G1 e também nos poços de controle da enzima muramidase. Procedeu-se com as diluições do produto testado da seguinte forma: a. Homogeneizou-se os primeiros poços A1, C1, E1 e G1 e passou-se 100 microlitros para os poços seguintes A2, C2, E2 e G2; b. Homogeneizou-se os poços e transferiu-se 100 microlitros para os poços seguintes até chegar aos poços B6, D6, F6 e H6. 4. Adicionou-se 100 microlitros do inóculo de *Clostridium perfringens* em todos os poços exceto os de controle do meio de cultivo e o controle da enzima muramidase.

A concentração inibitória mínima foi definida como a concentração mais baixa de ácido orgânico inibiu o crescimento visível das bactérias, após incubação de 24 horas a 42 °C. Todos os ensaios foram realizados em triplicata.

Figura 7 - Microplaca de diluição e seus respectivos poços com replicata das amostras, controle do inóculo, controle do meio e controle da enzima muramidase



Legenda: ● Controle do meio; ● Controle da enzima muramidase ● Controle do inóculo; ● Poços que deverão ser preenchidos com 100 microlitros de Muller Hinton caldo, em seguida realizada a diluição da enzima muramidase e por último adicionado o inóculo de *Clostridium perfringens*

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

6.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Por meio da tipificação toxigênica pela PCR múltipla foi demonstrado que a cepa de *Clostridium perfringens* foi do tipo A, com a amplificação para gene alfa toxina (cpa) de 324 pb, não havendo a detecção de outros genes testados. Thompson et al. (2006) demonstra em seu trabalho que a principal cepa isolada em surtos de enterite necrótica em aves, é o *Clostridium perfringens* tipo A, produtor da toxina α. Kumar, Kumar e Karthik (2019) detectaram gene da toxina alfa (cpa) em 288 amostras (248 suspeitas de enterite necrótica e 40 aparentemente saudáveis), indicando a presença de *Clostridium perfringens* tipo A. Young Park et al. (2015) demonstraram que todas as 88 amostras testadas foram de *Clostridium perfringens* tipo A, com gene produtor da toxina alfa. A alfa toxina é um dos principais fatores de virulência produzidos pelo *Clostridium perfringens* e o modo de ação da toxina alfa depende principalmente da hidrólise dos fosfolipídeos e desorganização da membrana promotora (Titball et al., 2000). A hidrólise dos fosfolipídeos resulta na formação de diacilglicerol, ativação da proteína quinase C e estimulação da cascata do ácido araquidônico. Como resultado há a síntese de mediadores inflamatórios como leucotrienos, tromboxanos, fator aglutinante de plaqueta e prostaciclina (Titball et al., 2000; Bunting et al., 1997). Estes mediadores causam vasoconstrição, agregação plaquetária, disfunção miocárdica e necrose das células, podendo levar o animal à morte (Van Immerseel et al., 2004).

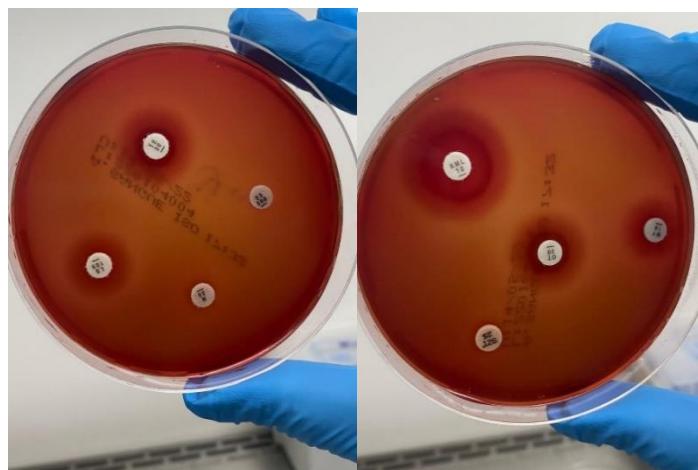
Na **tabela 15**, pode-se observar a distribuição da estirpe de *Clostridium perfringens* sensível e resistente aos antimicrobianos testados. Verifica-se que houve resistência da estirpe à mais de um princípio ativo, Sulfaclorpiridazina + Trimetoprima, Sulfonamidas e Neomicina, para o demais antimicrobianos testados, a estirpe apresentou-se sensível.

Tabela 15 – Halo (mm) de inibição do crescimento da estirpe de *Clostridium perfringens* frente aos antimicrobianos na medicina veterinária

Antimicrobiano	<i>Clostridium perfringens</i>		
	Sensível	Intermediário	Resistente
Amoxicilina	27	-	-
Lincomicina	20	-	-
Licomicina + Espectinomicina	18	-	-
Neomicina	-	-	10
Oxitetraciclina	22	-	-
Sulfaclorpiridazina + Trimetoprima	-	-	0
Sulfonamidas	-	-	0
Tetraciclina	22	-	-

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

Figura 8 - Teste de sensibilidade antimicrobiana pela técnica de difusão em disco



Fonte: Arquivo Pessoal (2023)

A Amoxicilina foi considerada sensível à estirpe de *Clostridium perfringens* em vários trabalhos (Wei *et al.*, 2020; Xu *et al.*, 2021; Gharaibeh *et al.*, 2010), corroborando com os dados de sensibilidade da estirpe de *Clostridium perfringens* frente à amoxicilina. Osman e Elhariri (2013) demonstraram que dos 125 isolados de *Clostridium perfringens* em aves de corte somente 2 a 3% apresentaram resistência para amoxicilina e 100% das amostras apresentaram resistência à Lincomicina. Segundo Anju *et al.* (2021), 15,79% das amostras isoladas de *Clostridium perfringens* foram resistentes fenotipicamente à Lincomicina. Llanco, Ferreira e Aila-Campos (2012) demonstram a resistência da cepa de *Clostridium perfringens* à Oxitetraciclina e Tetraciclina. Haider *et al.* (2022) observaram que em 20 amostras isoladas de *Clostridium perfringens* em aves de corte foi possível observar que 100% foram

resistentes à Neomicina e Trimetoprima, 95% resistentes à Tetraciclina e Lincomicina e 45% para Oxitetraciclina e todas foram sensíveis à Amoxicilina. Eid *et al.* (2023) detectaram resistência da cepa de *Clostridium perfringens* à sulfa-trimetoprim e alta resistência para Oxitetraciclina. Wei *et al.* (2020) demonstraram que dos 167 isolados de *Clostridium perfringens*, 77,8% apresentaram resistência a Sulfametoxazole + Trimetoprim e 60,0% à Tetraciclina. Mohiuddin *et al.* (2023) detectaram resistência da estirpe de *Clostridium perfringens* para Neomicina e resistência para a Tetraciclina, corroborando parcialmente com os resultados deste trabalho. Segundo Wu *et al.* (2022), dos 83 isolados de *Clostridium perfringens* em ovelhas, 95,2% foram resistentes para Sulfonamidas, 22,9% para tetraciclina e somente 1,2% para amoxicilina.

O ácido benzoico associado a óleos essenciais foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* da estirpe de *Clostridium perfringens* pelo teste da concentração inibitória mínima (CIM), com a diluição de 8 µg/ml. Já a enzima muramidase foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* da estirpe de *Clostridium perfringens* com a diluição de 64 µg/ml (**Tabela 16**). Os resultados mostraram que tanto o ácido benzoico associado a óleos essências, quanto a enzima muramidase apresentaram inibição de crescimento da estirpe de *Clostridium perfringens* *in vitro*.

Tabela 16 - Concentração inibitória mínima (CIM) da estirpe de *Clostridium perfringens*

MIC	<i>Clostridium perfringens</i>	
	MIC µg/ml	MIC µg/ml
	DMSO	Solução tampão ph 6
Ácido benzoico blend óleos essenciais	8	-
Muramidase	-	64

Fonte: Elaborado pela autora (2023).

O ácido benzoico associado a óleos essenciais foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* da estirpe de *Clostridium perfringens* pelo teste da concentração inibitória mínima (CIM), com a diluição de 8 µg/ml. Já a enzima muramidase foi capaz de inibir o crescimento *in vitro* da estirpe de *Clostridium perfringens* com a diluição de 64 µg/ml (**Tabela 16**). Os resultados mostraram que tanto o ácido benzoico associado a óleos essências, quanto a enzima muramidase apresentaram inibição de crescimento da estirpe de *Clostridium perfringens* *in vitro*.

Liu *et al* (2010), relataram que a utilização de lisozima exógena à dieta de frangos de corte reduziu significativamente a concentração de *C. perfringens* no íleo e melhorou a conversão alimentar das aves. Zhang *et al.* (2006) determinou em seu trabalho que a concentração inibitória mínima da lisozima de clara de ovo de galinha foi de 156 µg/ml para a triplicata de *Clostridium perfringens* tipo A. Nasution (2019) observou que a lisozima da clara do ovo de galinha foi capaz de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus*) e gram-negativas (*Escherichia coli* e *Salmonella Typhimurium*). Pereira (2019) relatou que a concentração de 300 µg/mL foi eficaz em reduzir o crescimento do *Staphylococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. Diversos trabalhos já foram publicados sobre a capacidade da lisozima de inibir outras espécies de *Clostridium* (Hughey; Johnson, 1987; Carini; Mucchetti; Neviani, 1985), porém há poucos trabalhos sobre o efeito inibitório da lisozima sobre o *Clostridium perfringens*. As lisozimas não possuem capacidade de matar os endósporos bacterianos, mas estimulam os esporos a germinar em células vegetativas (Lewis, 1969).

Giovagnoni *et al.* (2019) relataram inibição do crescimento de *Clostridium perfringens* com o uso de ácido benzoico, corroborando com os dados obtidos neste trabalho. European Food Safety Authority (2012) relatam que a atividade antimicrobiana testada *in vitro* do ácido benzoico blend óleos essenciais contra as cepas de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis* e *Bacillus subtilis* foram de valores iguais ou superiores a 2400 mg/kg, sugerindo que as concentrações alimentares não afetariam o crescimento das cepas em situação de criação. Estudos *in vitro* demonstram que os óleos essências possuem propriedades antibacterianas, antivirais, antifúngicas, antiparasitárias, antioxidantes, anti-inflamatórias, anti-tóxicas (Swamy; Akhtar; Sinniah, 2016; Gopi *et al.*, 2014). Já o Timol e Eugenol alteram a permeabilidade da membrana dos micro-organismos causando extravasamento dos materiais intracelulares (Pham *et al.*, 2020). Além disso, o timol, eugenol e o carvacrol são estruturalmente semelhantes e exercem efeitos antimicrobianos sinérgicos ou aditivos mesmo quando suplementados em concentrações mais baixas (Bassolé; Juliani, 2012). ‘

6.6 CONCLUSÃO

Com os resultados conclui-se que o gene alfa toxina (cpa) detectado é um dos principais fatores de virulência produzidos pelo *Clostridium perfringens*, a cepa isolada apresenta uma resistência múltipla aos antimicrobianos testados e a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) é determinante para adição em dietas de frangos de corte, em substituição aos antibióticos promotores de crescimento para garantir o desempenho zootécnico e melhora na saúde intestinal dos animais.

REFERÊNCIAS

- ANJU, K.; KARTHIK, K.; DIVYA, V.; PRIYADHARSHINI, Murugaiyan Latha Mala; SHARMA, Rajeev Kumar; MANOHARAN, Seeralan. Toxinotyping and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Clostridium perfringens* isolated from different sources of livestock and poultry. **Anaerobe**, v. 67, p. 102298, Feb. 2021. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2020.102298>
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties. **Molecules**, v.17, n. 4, p. 3989-4006, Apr. 2012. DOI: <https://doi.org/10.3390/molecules17043989>
- BAUER, A. W.; KIRBY, W. M.; SHERRIS, J. C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method **American journal of clinical pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BAUMS, C.G.; SCHOTTE, U.; AMTSBERG, G.; GOETHE, R. Diagnostic multiplex PCR for toxin genotyping of *Clostridium perfringens* isolates. **Veterinary Microbiology**, v.100, n. 1-2, p.11-16, 2004. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0378-1135\(03\)00126-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1135(03)00126-3)
- BUNTING, M.; LORANT, D. E.; BRYANT, A. E.; ZIMMERMAN, G. A.; McLNTYRE, T. M.; STEVENS, D. L.; PRESCOTT, S. M. Alpha toxin from *Clostridium perfringens* induces proinflammatory changes in endothelial cells. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 100, n. 3, p.565-574, Aug.1997.
- CARINI, S.; MUCCHETTI, G.; NEVIANI, E. Antimicrobial activity of lysozyme against clostridia and use in cheese production – a review. **Microbiologie Aliments Nutrition**, v. 3, p. 299–320, 1985.
- CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, M100.** 32nd.ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2023.
- DIARRA, M. S.; MALOUIN, F. Antibiotics in Canadian poultry productions and anticipated alternatives. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, p.2-15, Jun. 2014. DOI: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00282>
- DU, E.; GAN, L.; LI, Z.; WANG, W.; LIU, D.; GUO, Y. In vitro antibacterial activity of thymol and carvacrol and their effects on broiler chickens challenged with *Clostridium perfringens*. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v.6, n. 58, p.1–12, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40104-015-0055-7>
- EID, N.M.; AHMED, E.F.; SHANY, S.A.S.; DAHSHAN, A, M.; ALI, A. *Clostridium perfringens* em Broiler Chickens: Isolation, Identification, Typing, and Antimicrobial Susceptibility. **Journal World Poultry Research**, v.13, n.1, p.112-119, Mar. 2023.
- EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY. Scientific opinion on safety and efficacy of CRINA ® Poultry Plus (preparation of benzoic acid and essential oil compounds) a feed additive for chickens for fattening. **EFSA Journal**, v.10, n.3, p.2620, 2012. DOI: <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2012.2620>

- GAUCHER, M. L.; QUESSY, S.; LETELLIER, A.; ARSENAULT, J.; BOULIANNE, M. Impact of a drug-free program on broiler chicken growth performances, gut health, Clostridium perfringens and Campylobacter jejuni occurrences at the farm level. **Poultry Science**, v.94, n.8, p.1791–801, 2015. DOI: <https://doi.org/10.3382/ps/pev142>
- GHARAIBEH, S.; AL RIFAI, R.; AL-MAJALI, A. Molecular typing and antimicrobial susceptibility of Clostridium perfringens from broiler chickens. **Anaerobe**, v.16, n.6, p. 586-589, Dec. 2010. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2010.10.004>
- GHOLAMIANDEHKORDI, A.R.; TIMBERMONT, L.; LANCKRIET, A.; VAN DEN BROECK, W.; PEDERSEN, K.; DEWULF, J.; PASMANS, F.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R.; VAN IMMERSEEL, F. Quantification of Gut Lesions in a Subclinical Necrotic Enteritis Model. **Avian Pathology**, v.36, n. 5, p.375–382, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079450701589118>
- GIOVAGNONI, G.; TUGNOLI, B.; PIVA, A.; GRILLI, E. Organic acids and nature identical compounds can increase the activity of conventional antibiotics against Clostridium perfringens and Enterococcus Cecorum in vitro. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 28, n. 4, p.1398-1407, Dec. 2019. DOI: <https://doi.org/10.3382/japr/pfz101>
- GOHARI, I. M.; NAVARRO, M. A.; LI, J.; SHRESTHA, A.; UZAL, F.; MCCLANE, B. A. Pathogenicity and virulence of Clostridium perfringens. **Virulence**, v. 12, n. 1, p. 723-753, Dec. 2021. DOI: <http://doi.org/10.1080/21505594.2021.1886777>
- GOHARI, I. M.; PARREIRA, V. R.; NOWELL, V. J.; NICHOLSON, V. M.; OLIPHANT, K.; PRESCOTT, J. F. A Novel Pore-Forming Toxin in Type A Clostridium perfringens Is Associated with Both Fatal Canine Hemorrhagic Gastroenteritis and Fatal Foal Necrotizing Enterocolitis. **Plos One**, v. 10, n. 4, e0122684, 8 Apr. 2015. DOI: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0122684>.
- GOPI, M.; KARTHIK, K.; MANJUNATHACHAR, H. V.; KESAVAN, M.; DASHPRAKASH, M.; BALARAJUM B.L.; PURUSHOTHAMAN, M. R. Review article essential oils as a feed additive in poultry nutrition. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 1, p.1–7, 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.14737/journal.aavs/2014.2.1.1.7>
- HAIDER, Z.; ALI, T.; ULLAH, A.; BASIT, A.; TAHIRM H.; TARIQM H.; LLYAS, S.Z.; HAYAT, Z.; REHMAN, S. Isolation, toxinotyping and antimicrobial susceptibility testing of Clostridium perfringens isolated from Pakistan poultry. **Anaerobe**, v. 73, Feb. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102499>
- HUGHEY, V. L; A JOHNSON, E. Antimicrobial activity of lysozyme against bacteria involved in food spoilage and food-borne disease. **Applied And Environmental Microbiology**, v. 53, n. 9, p. 2165-2170, set. 1987. DOI: <http://doi.org/10.1128/aem.53.9.2165-2170.1987>.
- KEYBURN, A. L The true cost of necrotic enteritis. **World Poultry**, v.31, p.16–17, 2015.

KEYBURN, A. L.; BOYCE, J. D.; VAZ, P.; BANNAM, T. L.; FORD, M. E.; PARKER, D. DI RUBBO, A. ROOD, J. I.; MOORE, R. J. NetB, a new toxin that is associated with avian necrotic enteritis caused by *Clostridium perfringens*. **PLoS Pathogens**, v. 4, e26, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0040026>

KUMAR, N. P.; KUMAR, N. V.; KARTHIK, A. Molecular detection and characterization of *Clostridium perfringens* toxin genes causing enteritis in broiler chickens. **Tropical Animal Health and Production**, v. 51, p.1559-1569, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01847-9>

LEWIS, J.C. Dormancy. In: GOULD, G. W.; HURST, A. (ed.). **The bacterial spore**. London; New York: Academic Press, 1969. p. 301–358

LIU, D.; GUO, Y.; WANG, Z.; YUAN, J. Exogenous lysozyme influences *Clostridium perfringens* colonization and intestinal barrier function in broiler chickens. **Avian Pathology**, v. 39, n.1, p.17.24, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079450903447404>

LLANCO, L.; FERREIRA, A. J. P.; AILA-CAMPOS, M. J. Toxinotyping and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* isolated from broiler chickens with necrotic enteritis. **International Journal of Microbiology**, v.4, n.7, p. 290-294, 2012.

MOHIUDDIN, M.; SONG, Z.; LIAO, S.; QI, NANSHAN.; LI, J.; LV, M.; LIN, Z.; CAI, H.; HU, J.; LIU, S.; ZHANG, J.; GU, Y.; SUN, M. Animal Model Studies, Antibiotic Resistance and Toxin Gene Profile of NE Reproducing *Clostridium perfringens* Type A and Type G Strain Isolated frm Commercial Poultry Farms in China. **Microorganisms**, v.11, n. 3, p. 622, 2023. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms11030622>

NASUTION, S.; FARIDAH, D.N.; KUSUMANINGTYAS, E.; WULANDARI, Z.; KUSUMANINGRUM, H. D. Antibacterial activity and RP-HPLC charactesristic of lysozyme from local Chicken egg White after modification treatments. **SEAFAST International Seminar**, n.2, p. 84-88, 2019. DOI: <https://doi.org/10.5220/0009979300002833>

OSMAN, K.M.; Elhariri, M. Antibiotic resistance of *Clostridium perfringens* isolates from broiler chickens in Egypt. **Revue Scientifique et Technique**, v. 32, n. 3, p.841-850, 2013.

PARK, Ji Young; KIM, Sara; OH, Jae Young; KIM, Hye Ryoung; JANG, Il; LEE, Hee Soo; KWON, Yong Kuk. Characterization of *Clostridium perfringens* isolates obtained from 2010 to 2012 from chickens with necrotic enteritis in Korea. **Poultry Science**, v. 94, n. 6, p. 1158-1164, Jun. 2015. DOI: <http://doi.org/10.3382/ps/pev037>

PEREIRA, O. F. G. **Concentração inibitória e bactericida mínimas na atividade antimicrobiana da lisozima**. 2019. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Odontologia) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2019.

PHAM, V.H.; KAN, L.; HUANG, J.; GENG, Y.; ZHEN, W.; GUO, Y.; ABBAS, W.; WANG, Z. Dietary encapsulated essencial oils and organic acids mixture improves gut health in broiler chickens challenged with necrotic enteritis. **Journal of Animal**

Science Biotechnology, v. 11, p.1-18, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1186/s40104-019-0421-y>

RAMOS, C. P.; SANTANA, J. A.; COURA, F. M.; XAVIER, R. G. C.; LEAL, C. A. G.; OLIVEIRA JUNIOR, C. A.; HEINEMANN, M. B.; LAGE, A. P.; LOBATO, F. C. F.; SILVA, R. O. S. Identification and Characterization of *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Clostridium perfringens*, and *C. difficile* isolates from Reptiles in Brazil. **Biomed Research International**, v. 2019, p. 1-9, 27 May 2019. DOI: <http://doi.org/10.1155/2019/9530732>

REDA, F. M.; EL-SAADONY, M. T.; ELNESR, S. S.; ALAGAWANY, M.; TUFARELLI, V. Effect of Dietary Supplementation of Biological Curcumin Nanoparticles on Growth and Carcass Traits, Antioxidant Status, Immunity and Caecal Microbiota of Japanese Quails. **Animals**, v. 10, n. 5, p. 754, 26 abr. 2020. DOI: <http://doi.org/10.3390/ani10050754>

ROOD, J.I.; ADAMS, V.; LACEY, J.; LYRAS, D.; McCLANE, B.A.; MELVILLE, S.B.; MOORE, R.J.; POPOFF, M.R.; SARKER, M.R.; SONGER, J.G.; UZAI, F.A.; VAN IMMERSEEL, F. Expansion of the *Clostridium perfringens* toxin-based typing scheme. **Anaerobe**, v.53, p.5–10, Oct. 2018

ROSTAGNO, H. S.; ALBINO, L. F. T.; HANNAS, M. I. *et al.* **Tabelas brasileiras para aves e suínos: composição de alimentos e exigências nutricionais**. 4. ed. Viçosa: UFV, 2017.

SCHOCHEN-ITURRINO, R. P.; URBANO, T.; TROVÓ, K. V. P.; TREMILIOSI NETO, A.; MEDEIROS, A.; ISHI, M.; PAULILLO, A.C.; CARNEIRO, A.P.M. Uso de probióticos para frangos de corte: avaliação do desempenho zootécnico em aves desafiadas com *Clostridium perfringens*. **Ars Veterinária**, v.20, n.3, p.249-255, 2004.

SHEIHA, A. M.; ABDELNOUR, S. A.; ABD-EL-HACK, M. E.; KHAFAGA, A. F.; METWALLY, K. A.; EL-SAADONY, M. T. Effects of dietary biological or chemical-synthesized nano-selenium supplementation on growing rabbits exposed to thermal stress. **Animals**, v.10, n. 3, p.430, 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/ani10030430>

SONGER, J. Genotyping of *Clostridium perfringens* by Polymerase Chain Reaction is a Useful Adjunct to Diagnosis of Clostridial Enteric Disease in Animals. **Anaerobe**, v. 2, n. 4, p. 197-203, ago. 1996. DOI: <http://doi.org/10.1006/anae.1996.0027>.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, p. 1-21, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1155/2016/3012462>

TITBALL, R. W.; NAYLOR, C.E.; MILLER, J.; MOSS, D.S.; BASAK, A. K. Opening of the active site of *Clostridium perfringens* α -toxin may be triggered by membrane binding. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 290, n. 4-5, p. 357-361, Oct. 2000. DOI: [https://doi.org/10.1016/S1438-4221\(00\)80040-5](https://doi.org/10.1016/S1438-4221(00)80040-5)

- UZAL, F. A.; MCCLANE, B. A.; CHEUNG, J. K.; THEORET, J.; GARCIA, J. P.; MOORE, R. J.; ROOD, J. I. Animal models to study the pathogenesis of human and animal *Clostridium perfringens* infections. **Veterinary Microbiology**, v. 179, n. 1-2, p. 23-33, ago. 2015. DOI: <http://doi.org/10.1016/j.vetmic.2015.02.013>
- VAN IMMERSEEL, F.; DE BUCK, J.; PASMANS, F.; HUYGHEABAERT, G.; HAESEBROUCK, F.; DUCATELLE, R. *Clostridium perfringens* in poultry: an emerging threat for animal and public health. **Avian Pathology**, v. 33, n. 6, p. 537-549, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079450400013162>
- VIEIRA, A. A. S.; GUEDES, R. M. C.; SALVARANI, F. M.; SILVA, R. O. S.; ASSIS, R. A.; LOBATO, F. C. F. Genotipagem de *Clostridium perfringens* isolados de leitões diarréicos. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.75, n.4, p.513-516, out./dez., 2008. DOI: <https://doi.org/10.1590/1808-1657v75p5132008>
- WADE, B.; KEYBURN, A. L. The true cost of necrotic enteritis. **Word Poultry**, n.31, p.16-17, 2015.
- WEI, B.; CHA, S.; ZHANG, J.; SHANG, K.; PARK, H.; KANG, J.; LEE, K.; KANG, M.; JANG, H. K. Antimicrobial susceptibility and association with toxin determinants in *Clostridium perfringens* isolates from chickens. **Microorganisms**, v.8, n. 11, p.1825, Nov. 2020. DOI: <https://doi.org/10.3390/microorganisms8111825>
- WILLIAMS, R. B. Intercurrent Coccidiosis and Necrotic Enteritis of Chickens: Rational, Integrated Disease Management by Maintenance of Gut Integrity. **Avian Pathology**, v. 34, n. 3, p.159–180. 2005. DOI: <https://doi.org/10.1080/03079450500112195>
- WU, K. FENG, H.; MA, J.; WANG, B.; ZHANG, H.; LI, Y.J.R.; WANG, J.; YANG, Z. Prevalence, toxin-typing and antimicrobial susceptibility of *Clostridium perfringens* in sheep with different feeding modes from Gansu and Qianghai provinces, China. **Anaerobe**, v. 73, Feb. 2022. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2022.102516>
- XU, W.; WANG, H.; LIU, L.; MIAO, Z.; HUO, Y.; ZHONG, Y. Prevalence and characterization of *Clostridium perfringens* isolated from different chicken farms in China. **Anaerobe**, v.72, Dec. 2021. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2021.102467>
- ZHANG, G.; DARIUS, S.; SMITH, S.R.; RITCHIE, S.J. In vitro inhibitory effect of hen egg White lysozyme on *Clostridium perfringens* type A associated with broiler necrotic enteritis and its α -toxin production. **Letters in Applied Microbiology**, n. 42, n. 2, Feb. 2006. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2005.01812.x>