

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA ANIMAL

**CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS E
EFEITO SOBRE *Campylobacter* TERMOTOLERANTES DE ORIGEM
AVÍCOLA**

Luíza Toffano Seidel Calazans

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cíntia Silva Minafra e Rezende

GOIÂNIA

2020



**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR
VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES
NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem resarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

O conteúdo das Teses e Dissertações disponibilizado na BDTD/UFG é de responsabilidade exclusiva do autor. Ao encaminhar o produto final, o(a) autor(a) e o(a) orientador(a) firmam o compromisso de que o trabalho não contém nenhuma violação de quaisquer direitos autorais ou outro direito de terceiros.

1. Identificação do material bibliográfico: Dissertação Tese

2. Identificação da Tese ou Dissertação:

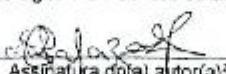
Nome completo do(a) autor(a): Luiza Toffano Seidel Calazans

Título do trabalho: CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS E EFEITO SOBRE *Campylobacter* TERMOTOLERANTES DE ORIGEM AVÍCOLA

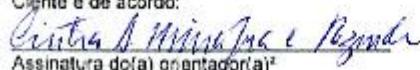
3. Informações de acesso ao documento:

Concorda com a liberação total do documento SIM NÃO¹

Independentemente da concordância com a disponibilização eletrônica, é imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.


Assinatura do(a) autor(a)²

Ciente e de acordo:


Assinatura do(a) orientador(a)

Data: 16 / 05 / 20

¹ Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante: a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a); b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação. O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente;
- Submissão de artigo em revista científica;
- Publicação como capítulo de livro;
- Publicação da dissertação/tese em livro.

² As assinaturas devem ser originais sendo assinadas no próprio documento. Imagens coladas não serão aceitas.

LUÍZA TOFFANO SEIDEL CALAZANS

**CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS E
EFEITO SOBRE *Campylobacter* TERMOTOLERANTES DE ORIGEM
AVÍCOLA**

Dissertação apresentada para obtenção do grau de Mestre em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração:

Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de alimentos.

Linha de Pesquisa:

Segurança alimentar

Orientadora:

Prof.^a. Dr^a. Cíntia Silva Minafra e Rezende – EVZ/UFG

Comitê de orientação:

Prof.^a Dr. ^a Maria Auxiliadora Andrade – EVZ/UFG

Prof.^a Dr. ^a Bruna Aparecida Souza Machado – SENAI CIMATEC – Bahia

GOIÂNIA

2020

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do
Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Toffano Seidel Calazans, Luíza
CARACTERIZAÇÃO DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS E EFEITO
SOBRE *Campylobacter* TERMOTOLERANTES DE ORIGEM
AVÍCOLA [manuscrito] / Luíza Toffano Seidel Calazans. - 2020.
LXXIX, 79 f.: il.

Orientador: Profa. Dra. Cíntia Silva Minafra e Rezende; co-
orientadora Dra. Maria Auxiliadora Andrade; co-orientador Dr. Bruna
Aparecida Souza Machado.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Escola
de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em
Ciência Animal, Goiânia, 2020.

Inclui fotografias, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Efeito antimicrobiano. 2. Efeito protetor. 3. Extratos naturais. 4.
Patógeno de origem alimentar. I. Silva Minafra e Rezende, Cíntia, orient.
II. Título.

CDU 664



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

Ata nº 545 da sessão de Defesa de Dissertação de **Luíza Toffano Seidel Calazans**, que confere o título de Mestre(a) em Ciência Animal, na área de concentração em Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de Alimentos.

Aos vinte e nove dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte a partir das 09h30min, na sala 03 (auditório) do setor de Pós-Graduação da EVZ/UFG realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada “Efeito de extratos de própolis sobre *Campylobacter* termotolerantes de origem avícola”. Os trabalhos foram instalados pelo(a) Orientador(a), Prof.^a Dr.^a Cintia Silva Minafra e Rezende (EVZ/UFG) com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. Weslen Fabricio Pires Teixeira (EVZ/UFG), membro titular interno; Prof.^a Dr.^a Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro Tenório (EVZ/UFG), membro titular externo ao programa. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata aprovada pelos seus membros. Proclamados os resultados pelo(a) Prof.^a Dr.^a Cintia Silva Minafra e Rezende, Presidente da Banca Examinadora, foram encerrados os trabalhos e, para constar, lavrou-se a presente ata que é assinada pelos Membros da Banca Examinadora, aos vinte e nove dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte.

TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA

Caracterização de extratos de própolis e efeito sobre *Campylobacter* termotolerantes de origem avícola



Documento assinado eletronicamente por **Cintia Silva Minafra E Rezende, Professora do Magistério Superior**, em 29/02/2020, às 11:58, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Weslen Fabricio Pires Teixeira, Professor do Magistério Superior-Visitante**, em 29/02/2020, às 12:00, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Clarice Gebara Muraro Serrate Cordeiro Tenório, Professora do Magistério Superior**, em 29/02/2020, às 12:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site
https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_verificar&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 1183853 e o código CRC 3CB6AB2A.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas incríveis oportunidades que me foram dadas durante a realização desse trabalho e por ter me dado a sabedoria necessária para aproveitar cada uma delas. Agradeço por ter me fortalecido e amparado nos dias ruins e me mostrado através dos dias bons o quanto era importante continuar. Hoje agradeço por coisas que já pedi em oração e é gratificante ver como o Senhor esteve presente em cada etapa.

À minha mãe, Angélica Toffano Seidel Calazans por ter sido mais que minha mãe durante o mestrado. Por sempre ter se disponibilizado a ajudar mesmo sendo de uma área tão diferente. Por ter sido também psicóloga, orientadora, estatística e amiga. Por toda paciência, amor e otimismo. Você é meu maior exemplo de mulher, meu maior exemplo acadêmico e é por cientistas como você que a ciência brasileira existe. Ao meu pai, Erli Calazans Correa, por sempre me incentivar a me especializar cada vez mais e sempre apoiar as minhas decisões, por mais difíceis que elas fossem. Por sempre ter arrumado soluções para quaisquer problemas que tivesse. Você é meu maior exemplo de honestidade. Saber que tenho vocês dois sempre ao meu lado, faz a minha caminhada ficar mais leve. A vocês, todo o meu amor e gratidão, para sempre.

À minha orientadora, Professora Dr^a Cíntia Silva Minafra e Rezende, por ter me aceitado como orientada e acreditar na minha competência. Por todas as palavras de otimismo, carinho e confiança. Por sempre ter uma solução e um caminho melhor a ser trilhado em meio ao meu desespero. Por todas as considerações e conselhos. Obrigada por ser muito mais do que só o necessário. A senhora é uma profissional ética, competente e muito humana. O Brasil precisa de mais professores como a senhora. Obrigada por tudo.

Agradeço ao meu noivo, Lucas Alves de Paulo Silva por todo incentivo, paciência e amor nesses dois anos de projeto e dez anos de vida juntos. Por nunca ter me deixado desanimar e sempre ter tido tanto orgulho do meu trabalho. Obrigada por sempre me motivar a acreditar que no final daria certo. Sei que não foram dois anos fáceis e obrigada por encará-los comigo.

Agradeço à Layane Martins Maia pela incrível parceria ao longo desses dois anos de pesquisa. Por compartilhar comigo os momentos de alegria, tristeza, angústia e emoção dentro e fora do laboratório que permearam essa jornada. Obrigada pela amizade e companheirismo. Agradeço à Daniella Ferreira Cordeiro Gomes e Lucas Andrade Mendes pela paciência, amizade e pelos conselhos que foram essenciais nessa fase da minha vida. Vocês me ajudaram a tomar as

decisões certas. Agradeço a Renata Teixeira Pfrimer pela alegria de todos os dias no laboratório e pela companhia nas oito horas de viagem a Uberlândia. Obrigada pela empatia. Se não fosse você, as lembranças com certeza não seriam as mesmas.

Agradeço à Isabela Arnosti por todos os momentos compartilhados, aos desabafos e confissões. Por todas as revisões realizadas e conselhos dados. Agradeço por ser a melhor amiga que eu poderia ter. Você merece o mundo.

Agradeço aos colaboradores do Centro de Pesquisa em Alimentos que facilitaram a execução deste estudo e as colaboradoras do setor de esterilização de materiais do Laboratório de Microbiologia de Alimentos pela prestatividade e auxílio.

Agradeço ao CNPq pela bolsa concedida durante esse período que foi imprescindível a realização dessa pesquisa. Por fim, à Universidade Federal de Goiás, em especial à Escola de Veterinária e Zootecnia, a qual orgulhosamente posso chamar de lar. À todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal meu sincero respeito e agradecimento pelos ensinamentos transmitidos

Muito obrigada!

“Existem muitas hipóteses em ciência que estão erradas. Isso é perfeitamente aceitável, elas são a abertura para achar as que estão certas.”

Carl Sagan

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1. <i>Campylobacter</i> termotolerante.....	3
2.2 <i>Campylobacter</i> termotolerante e a indústria de alimentos avícolas	5
2.3. Campilobacteriose	7
2.4 Resistência a antimicrobianos (RAM)	10
2.4 Própolis	13
2.4.1 Origem Botânica e Composição química.....	14
2.4.2 Propriedades	15
2.5 Justificativa	16
3. OBJETIVOS	17
3.1 Objetivo geral.....	17
3.2 Objetivos específicos.....	17
4. HIPÓTESES	18
5. MATERIAL E MÉTODOS	19
5.1 Obtenção dos extratos	19
5.2 Identificação de compostos bioativos dos extratos de própolis	20
5.2.1 Determinação dos compostos fenólicos totais	20
5.2.2 Determinação do teor de flavonoides totais	20
5.2.3 Determinação da atividade antioxidante total pelo radical livre DPPH	21
5.2.4 Diluições utilizadas dos extratos de própolis.....	21
5.3 Bactérias de coleções e isolados de campo.....	21
5.4 Fluxograma da atividade experimental	23
5.4.1 Preparação dos inóculos bacterianos.....	24
a) Ensaio de recuperação	24

b) Ensaio de motilidade	24
5.4.2 Preparação e utilização da solução de resazurina	24
5.5 Ensaios de microdiluição	25
5.6 Microscopia óptica por contraste de fase	26
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
8. CONCLUSÃO.....	49
9. REFERÊNCIAS	50

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 – Etapas da atividade experimental	23
FIGURA 2 - Concentrações extrato de própolis etanólico vermelho (VoEC17) de Canavieiras do ano de 2017, extrato obtido por extração assistida por ultrassom de própolis vermelha (VoUC17) de Canavieiras do ano de 2017, extrato etanólico de própolis verde (VeEP13) do Paraná do ano de 2013 e extrato obtido por extração assistida por ultrassom de própolis verde (VeUP13) do Paraná do ano de 2013. Colunas de 1 a 11 correspondem às diluições de cada extrato 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,781; 0,390 e 0,195 e 0,097 mg/mL, respectivamente. A coluna 12 foi destinada ao controle da solução de resazurina a 0,01% (presença do microrganismo sem adição do extrato da própolis).	25
FIGURA 3 - Fotografias das imagens obtidos por microscopia óptica. (A) Densidade bacteriana classificada por escala própria como muito baixa (-); (B) Densidade bacteriana classificada por escala própria como baixa (+); (C) Densidade bacteriana classificada por escala própria como média (++) e (D) Densidade bacteriana classificada por escala própria como alta (+++).	27
FIGURA 4 – Microplaca após incubação dos isolados de <i>Campylobacter jejuni</i> (CJ – 5) por 48 horas de incubação e adição da solução de resazurina. As colunas de 1 a 11 correspondem às diluições de cada extrato 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,781; 0,390 e 0,195 e 0,097 mg/mL, respectivamente. A coluna 12 representa o controle da solução de resazurina a 0,01% (presença do microrganismo sem adição do extrato da própolis). Cor de azul a lilás indica ausência de células viáveis e cor rosa indica a presença de células viáveis.	42
FIGURA 5 - Imagens obtidas por microscopia óptica nas quais observa-se a presença de bacilos. (A) – Densidade bacteriana classificada por escala própria como alta (+++) e presença de bacilos; (B) - Densidade bacteriana classificada por escala própria como média (++) e presença de bacilos.	45
FIGURA 6 –Microplaca com isolados (A) <i>Campylobacter lari</i> – CL; (B) <i>Campylobacter</i> spp. – C; (C) <i>Campylobacter coli</i> – CC5; (D) <i>Campylobacter coli</i> – CC8 após 48 horas de incubação e adição da solução de resazurina. As colunas de 1 a 11 correspondem às seguintes diluições de cada extrato: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,781; 0,390	

e 0,195 e 0,097 mg/mL, respectivamente. A coluna 12 representa o controle da solução de resazurina a 0,01% (presença do microrganismo sem adição do extrato da própolis). Cor de azul a lilás indica ausência de células viáveis e cor rosa indica a presença de células viáveis..... 46

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Padronização entre a quantificação da densidade bacteriana e o escore numérico utilizado para a elaboração dos gráficos	27
TABELA 2 - Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais (mg EAG/g), flavonoides (mg EQ/g) e da atividade antioxidante por DPPH (%) dos quatros extratos.	28
TABELA 3 - Efeito do extrato etanólico (EE) e extrato obtido por ultrassom (EU) de própolis verde, originária do Paraná (2013) sobre isolados de <i>Campylobacter</i> termotolerantes identificados em carcaças de frangos.....	31
TABELA 4 - Efeito do extrato etanólico (EE) e extrato obtido por ultrassom (EU) de própolis vermelha, originária da Bahia (2017) sobre isolados de <i>Campylobacter</i> termotolerantes identificados em carcaças de frangos.....	33
TABELA 5- Efeito do extrato de própolis vermelha obtido por extração convencional etanólica, originário de Canavieiras - Bahia, obtido no ano de 2017 sobre cepas referência e isolados de <i>Campylobacter</i> termotolerantes obtidas de alimento de origem avícola	35
TABELA 6 - Efeito do extrato de própolis vermelha obtido por extração assistida por ultrassom, originário de Canavieiras - Bahia, obtido no ano de 2017 sobre cepas referência e isolados de <i>Campylobacter</i> termotolerantes obtidas de alimento de origem avícola.	36
TABELA 7 - Efeito do extrato de própolis verde obtido por extração convencional etanólica, originário do Estado do Paraná, obtido no ano de 2013 sobre cepas referência e isolados de <i>Campylobacter</i> termotolerantes obtidas de alimento de origem avícola.	37
TABELA 8- Efeito do extrato de própolis verde obtido por extração assistida por ultrassom, originário do Estado do Paraná, obtido no ano de 2013 sobre cepas referência e isolados de <i>Campylobacter</i> termotolerantes obtidas de alimento de origem avícola.	39

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1 – Descrição das própolis, tipo de extração e localidade de origem dos extratos utilizados no trabalho	21
QUADRO 2 – Descrição das espécies de <i>Campylobacter</i> utilizadas no trabalho e o número de isolados testados de cada uma	24

RESUMO

Campylobacter termotolerantes relacionam-se a um grupo de patógenos que são veiculados por alimentos e atualmente são considerados como os principais patógenos de ocorrência global e com alta frequência de resistência a antimicrobianos. Pelo exposto, o presente estudo teve por objetivo identificar biocompostos presentes em quatro extratos de própolis verde e vermelha e avaliar alternativas quanto ao potencial antimicrobiano. Foram avaliados extratos originários do Brasil, obtidos por extração convencional etanólica e extração assistida por ultrassom. Quatro culturas de coleções e vinte e cinco isolados de três espécies (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari*) compuseram o estudo. A técnica utilizada foi a de microdiluição em caldo em placa de 96 poços que permitiu analisar onze concentrações de extratos de própolis (0,01 a 100 mg/mL⁻¹). Observou-se variabilidade para atividade antimicrobiana. Identificou-se maior viabilidade microbiana e motilidade, por microscopia óptica, nas maiores concentrações de própolis testadas. Quanto ao efeito sobre viabilidade bacteriana da própolis vermelha com relação a própolis verde, a primeira foi mais eficiente. Não foi observada diferença quanto aos métodos de extração. Conclui-se que os extratos de própolis apresentaram efeito antimicrobiano insatisfatório, bem como efeito protetor celular para altas concentrações deste estudo, independentemente do método de extração, o que pode ter conotação desejável para diagnóstico laboratorial.

Palavras-chave: Efeito antimicrobiano; efeito protetor; extratos naturais; patógeno de origem alimentar.

ABSTRACT

Thermotolerants *Campylobacter* are related to a group of pathogens that are carried by food and are currently considered as the main ones of global occurrence and with high frequency of resistance to antimicrobials. From the above, the present study aimed to identify biocomposites present in four extracts of green and red propolis and to evaluate alternatives regarding the antimicrobial potential. Extracts from Brazil, obtained by conventional ethanol extraction and extraction assisted by ultrasound, were evaluated. Four cultures of collections and twenty-five isolates from three species (*Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* and *Campylobacter lari*) comprised the study. The technique used was microdilution in broth in a 96-well plate, which allowed the analysis of eleven concentrations of the propolis extracts (0.01 to 100 mg / mL-1). Variability was observed for antimicrobial activity. Greater microbial viability and motility were identified by optical microscopy at the highest concentrations of propolis tested. In addition, regarding the effect on bacterial viability of red propolis in relation to green propolis, the red one showed more efficient. There was no difference in extraction methods. It is concluded that the propolis extracts had an unsatisfactory antimicrobial effect, as well as a cellular protective effect for high concentrations in this study, regardless of the extraction method, which may have a desirable connotation for laboratory diagnosis.

Keywords: antimicrobial effect; foodborne pathogen; protective effect; natural extracts

1. INTRODUÇÃO

Campilobacteriose é considerada uma importante gastroenterite que afeta os humanos, estando entre as principais causas globais de doenças diarreicas, cuja incidência e prevalência vêm aumentando nos últimos 10 anos¹⁻⁴. As principais bactérias envolvidas no desenvolvimento dessa doença em humanos são as classificadas como termotolerantes, sendo *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari*, *C. upsaliensis*⁵ responsáveis pela infecção. Opta-se neste trabalho por utilizar a terminologia *Campylobacter* se referindo as espécies termotolerantes.

Como fontes de infecção para os seres humanos pode-se citar alimentos contaminados, como, leite cru, água e as carnes contaminadas, destacando-se a carne de frango^{4, 6, 7}. *Campylobacter* são consideradas bactérias comensais do trato gastrintestinal de frangos de corte e estabelecem colonização persistente sem que o animal apresente sintomatologia clínica visível^{8, 9}. Os frangos de corte podem possuir grandes cargas bacterianas e permanecer infectados até o abate, aumentando as chances de ocorrência de contaminação cruzada de carcaças de frango nas áreas de processamento⁹.

O aumento da resistência antimicrobiana em patógenos de origem alimentar, entre eles, *Campylobacter*, é reconhecido por várias autoridades internacionais, incluindo a Organização Mundial de Saúde (OMS), como preocupação emergente de saúde pública¹⁰. O *Center of Disease Control* (CDC) estimou em 2019 que *Campylobacter* cause por ano cerca de 1.500.000 infecções somente nos Estados Unidos e que 29% delas sejam causadas por isolados resistentes a antimicrobianos¹¹.

Uma possibilidade que vem sendo pesquisada como forma alternativa ao uso de antimicrobianos no combate a microrganismos patogênicos é o uso de extratos ou substâncias naturais. Historicamente as plantas e diferentes matrizes naturais foram utilizadas na medicina como fontes de diversas substâncias, muitas delas com potenciais antimicrobianos para o tratamento de diversas patologias. Dessa forma, as matrizes naturais podem ser estudadas como fonte alternativa estratégica de compostos com diferentes propriedades biológicas¹². Neste contexto, os extratos obtidos a partir da própolis são uma possível alternativa a ser explorada.

A própolis é composta por substâncias resinas, gomosas e balsâmicas, coletadas pelas abelhas, de brotos e flores, acrescidas de secreções salivares, ceras e

pólen^{13, 14}. Sua coloração, consistência, composição química e, consequentemente a atividade biológica, dependem da sua origem vegetal, da época do ano e região na qual foi produzida¹⁵⁻¹⁷. Dessa forma, já foram identificados mais de 420 compostos em amostras de própolis, dentre esses: ácidos graxos e ácidos fenólicos, flavonoides, terpenos e aldeídos que influenciam em suas propriedades físicas, químicas e biológicas¹⁸⁻²¹. Além disso, diferentes estudos demonstraram que a composição química e atividade biológica dos extratos de própolis variam a depender do método de extração empregado, evidenciando que as condições de extração influenciam diretamente no rendimento e na seletividade de alguns compostos, e consequentemente, no potencial biotecnológico dos extratos obtidos²²⁻²⁴.

O método de extração com etanol é o mais comumente utilizado pela indústria para obter diferentes tipos de extratos de própolis, mas apresenta desvantagens como a baixa seletividade e baixo rendimento na extração de alguns compostos, além de longos períodos de extração o que gera aumento de custos ao processo^{22, 25}. A extração por ultrassom e a extração supercrítica de fluidos têm sido utilizadas com o objetivo de aumentar a eficiência da extração de importates compostos bioativos da própolis^{24, 26, 27}. Devido às diferentes propriedades biológicas cientificamente comprovadas, a própolis é considerada uma importante matriz alternativa para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos ou ingredientes funcionais em alimentos^{22, 28-30}.

Dentro desse contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia antimicrobiana de diferentes extratos de própolis vermelha e verde, obtidos por dois métodos de extração (ultrassônica e etanólica), frente à isolados de *Campylobacter* de origem avícola.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. *Campylobacter* termotolerante

A família *Campylobacteraceae* inclui 32 espécies, 13 subespécies no gênero *Campylobacter*, nove no gênero *Arcobacter*, sete no gênero *Sulfurospirillum* e uma espécie no gênero *Dehalospirillum*³¹. Particularmente as espécies de *Campylobacter* de interesse em alimentos são aquelas classificadas como termotolerantes, são elas *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* e *Campylobacter upsaliensis*³². Essa denominação se deve à sua capacidade de crescer entre 37 e 42°C com temperatura ótima de 41,5°C³³. Por serem inativadas por processos como a pasteurização ou cocção adequada, não são consideradas termorresistentes³⁴.

As espécies do gênero *Campylobacter* possuem como principais características a forma de bacilos curvos, em formato de S ou espirais que podem medir de 0,2-0,8 µm de largura e 0,5-5 µm de comprimento^{4, 32}. São bactérias Gram-negativas, não formadoras de esporos, com flagelos polares únicos em uma ou ambas as extremidades, o que possibilita motilidade semelhante a saca-rolhas, na qual as bactérias giram em torno do seu próprio eixo^{32, 35}.

O gênero é considerado fastidioso, devido à sua multiplicação ocorrer de forma lenta. Essa característica pode estar associada ao pequeno tamanho do seu genoma (aproximadamente 1,64 Mb), sequenciado completamente no ano de 2000³⁶. São bactérias microaerófilas, necessitando baixa tensão de oxigênio para multiplicação. Seu crescimento é inibido quando a concentração de O₂ é menor que 3% e maior que 15%, sendo 5% a concentração considerada ideal. Além disso, são capnofílicos, pois requerem cerca de 10% de CO₂ para sua multiplicação³⁷. Dessa forma, a atmosfera ótima para seu crescimento é composta de 5% de O₂, 10% de CO₂ e 85% de N₂³⁸.

Meios com pH abaixo de 4,9, visto que esse microrganismo apresenta faixa de pH ótimo próximo do neutro (6,5-7,5), e concentração acima de 2% de cloreto de sódio (NaCl) são desfavoráveis ao seu desenvolvimento, o que explica o fato de pessoas que fazem uso contínuo de medicamentos antiácidos serem mais propensas a desenvolverem gastroenterites ocasionadas por essa bactéria^{37, 39, 40}. São também sensíveis à desidratação, tendo seu valor de atividade de água ótimo 0.997, variando até >0.987⁴¹. Com relação à

sua nutrição, são microrganismos quimiorganotróficos que obtêm suas fontes de energia de aminoácidos ou ciclos intermediários de ácidos tricarboxílicos e não são capazes de metabolizar carboidratos e lipídeos⁴.

Diferentemente de outros patógenos entéricos, esse microrganismo é relativamente sensível às pressões ambientais o que impossibilita a sua multiplicação fora do hospedeiro⁴². Diversas hipóteses foram apresentadas para explicar a sua sobrevivência nessas condições, incluindo a de que ele sobreviva no ambiente formando biofilmes e entrando no estado viável, mas não cultivável (VNC)^{43, 44}.

Fora do agente hospedeiro esse patógeno é exposto a vários fatores estressores como por exemplo, a exposição ao oxigênio, as mudanças de temperatura, dessecação, variação de pH, ausência de fontes de nutrição, entre outros, o que representa grande desafio à sua sobrevivência⁴³. O aumento da tensão de oxigênio na atmosfera é o fator mais estressante e comprometedor à viabilidade das espécies de *Campylobacter* durante o seu ciclo de transmissão⁴⁵.

O estágio VNC é caracterizado por diminuição da atividade metabólica, aumento da produção de enzimas de captura de substrato e encolhimento celular. Em VNC, o patógeno sobrevive a condições adversas por longos períodos^{46, 47}. Esse estado é considerado de extrema importância em relação à saúde humana e saúde pública pois, por não ser cultivável, mesmo quando uma etapa de enriquecimento é usada para recuperar células injuriadas, os métodos de isolamento convencional não são capazes de identificar o microrganismo no alimento e ainda sim, as células permanecem potencialmente patogênicas^{34, 48, 49}.

Chaisowwong et al.⁵⁰, demonstraram que amostras de *Campylobacter jejuni* em estado VNC continuaram expressando genes de virulência e aderindo a células epiteliais comprovando a teoria de que essas células possuem potencial infeccioso. Isso justificaria, em parte, o desconhecimento das fontes de contaminação das infecções geradas por esse microrganismo⁵¹. Estudos demonstraram a capacidade de células de *Campylobacter jejuni* em estado VNC aderirem a superfícies iniciando a formação de biofilmes ou mesmo se associar a células já em matrizes de biofilmes pré-existentes⁵²⁻⁵⁴.

A formação de biofilme é uma estratégia de sobrevivência em ambientes hostis, além de ser uma forma de se propagar entre hospedeiros e aderir a diferentes superfícies, como alimentos secos, produtos frescos, e equipamentos em áreas de processamento

industrial⁵⁵. Esses biofilmes podem resultar em sérias complicações à saúde dos consumidores, além de perdas econômicas devido à deterioração precoce dos alimentos⁵⁶.

Fatores ambientais, como materiais de superfície, nutrientes, pH, temperatura, oxigênio e umidade, desempenham papel significativo na produção de biofilme. Fatores intracelulares, como os genes associados à produção de polissacarídeos de superfície, respiração, sistema regulador de dois componentes, detecção de quórum e motilidade também desempenham função importante na produção dessa estrutura. Nos biofilmes, as células bacterianas se tornam menos suscetíveis à ação de desinfetantes e antimicrobianos devido à presença de uma espessa camada extracelular de polissacarídeos que impede os agentes antimicrobianos de atingi-las⁵⁵. Por esta razão, biofilmes podem servir como importante fonte de contaminação cruzada na cadeia de produção de alimentos⁴⁵.

2.2 *Campylobacter* termotolerante e a indústria de alimentos avícolas

O padrão microbiológico para carnes de aves em relação à presença de *Campylobacter* ainda não está completamente estabelecido. A Autoridade Européia para Segurança de Alimentos (EFSA)⁵⁷, propõe para carne de aves um limite crítico de 10³ UFC/g como um valor de contaminação indicativo, acima do qual se tornam iminente a necessidade de adoção de medidas corretivas para preservar a higiene do processo produtivo. O *Center of Disease Control and Prevention* (CDC)⁵⁸ registrou a necessidade de poucas bactérias para que um ser humano apresente sintomas, mais especificamente, menos de 500 UFC/g. No entanto, pela adaptação e dinâmica populacional, o fato do alimento conter *Campylobacter* o classifica como impróprio para o consumo.

O crescimento da população mundial requer o aumento da produção de alimentos em todo planeta. Dentro deste contexto, a indústria avícola destaca-se como fornecedora de proteína animal de baixo custo, o que leva à criação de frangos de corte a ser uma atividade de grande importância econômica internacional. A avicultura brasileira destaca-se mundialmente por ser economicamente eficiente, apresentar baixo custo de produção e alta qualidade de produtos o que permite considerá-la altamente competitiva. O elevado status sanitário na avicultura nacional é um dos principais atributos da carne de frango brasileira⁵⁹.

Ressalta-se que, com produção em larga escala, aumenta-se também o risco de contaminação dos alimentos, podendo ocorrer em diversas etapas: na produção da matéria prima, nas linhas de processamento do alimento, por manipuladores ou equipamentos, por exemplo, ou até mesmo nas etapas de armazenamento, acondicionamento e distribuição que permitem a exposição direta ao ambiente⁶⁰.

Na pesquisa mais recente do *Public Health England*⁶¹, a prevalência de *Campylobacter* no Reino Unido no frango resfriado no varejo, foi de 54% (2304/4268). Nesse período, 6% (256/4268) das amostras apresentaram valores maiores das amostras apresentaram valores maiores que 1000 UFC por grama de pele de frango.

Estudo realizado em Oklahoma, nos Estados Unidos buscou identificar a prevalência de amostras positivas para *Campylobacter* em frangos de corte e perus no comércio varejista da cidade⁶². Foi detectado maior prevalência em frangos provenientes de granjas do que naqueles advindos do sistema orgânico de produção. Das 53 amostras identificadas, 42 (79,24%) eram *Campylobacter jejuni*, oito (15,09%) eram *Campylobacter coli* e três (5,66%) isolados foram contaminados com ambas as espécies. A maioria dos isolados de peru apresentou resistência a mais de sete antimicrobianos, enquanto a maioria dos isolados recuperados de frangos foram resistentes a cinco a sete antimicrobianos. A resistência a múltiplas drogas não se limitou a isolados de fontes oriundas do sistema intensivo de produção, mas também estava disponível em isolados do sistema orgânico e foi geralmente mais baixa em *Campylobacter jejuni* quando comparados aos de *Campylobacter coli*⁶².

Outro estudo identificou a ocorrência de *Campylobacter* em carcaças em uma planta comercial de codornas, ocasião em que se observaram 32,9% das carcaças obtidas positivas. Dos 28 isolados recuperados, 18 (64%) eram *Campylobacter jejuni* e 10 (36%) eram *Campylobacter coli*. Além disso, a resistência à tetraciclina foi detectada em todos os 28 (100%) isolados⁶³.

Ressalta-se ainda que, o mesmo padrão de resultados também foram observados em estudos realizados no continente africanos. Em Sokoto, no nordeste da Nigéria, a prevalência de *Campylobacter* em carne de frango foi de 81,9% em áreas de processamento de carnes de aves⁶⁴, enquanto que em açougues e lojas varejistas no sudoeste da Nigéria a prevalência encontrada foi de 96%⁶⁵. A prevalência média relatada para carne de frango no Senegal e na África do Sul foi de 73,1%, em contrapartida, estudos em Gana e na Etiópia a prevalência encontrada foi próxima a 22%^{66,67}. Na Argélia, cepas

isoladas de perus mostraram resistência à tetraciclina (81,3%), ciprofloxacina (75,0%) e eritromicina (25,0%). Foram identificados 18 padrões de resistência a drogas e, além disso, 96,9% dos isolados eram multirresistentes⁶⁸.

No Brasil, Franchin et al.⁶⁹ descreveram alta prevalência de *Campylobacter* em carcaças de frango durante o processamento na região Sul do país (71,3%). Em Goiás, a presença de *Campylobacter* em frango identificou 24% das carcaças positivas para o gênero⁷⁰. Há poucos estudos realizados levando em conta o produto final disponibilizado ao varejo brasileiro. Em um desses estudos, realizado na região do Distrito Federal e Brasília, *Campylobacter jejuni* foi encontrado em 19,6% das carcaças de frango resfriado obtidas em diferentes estabelecimentos comerciais. Embora essa bactéria tenha sido detectada em carcaças de frangos de corte, a sua prevalência em cortes no varejo é pouco conhecida⁷¹.

Estudo realizado no sul do país isolou 50 cepas de abatedouros frigoríficos no estado do Rio Grande do Sul em 2012. As cepas foram investigadas quanto à suscetibilidade antimicrobiana contra ciprofloxacina, ácido nalidíxico e eritromicina pela técnica de obtenção da concentrações inibitórias mínima. Os resultados demonstraram que 98% (49) dos isolados eram sensíveis à eritromicina e 94% (47) dos isolados era resistente à ciprofloxacina e 90% (45) ao ácido nalidíxico⁷².

Não existe no país, até o presente momento um sistema de vigilância que contemple essa bactéria. Entretanto, essa realidade tende a mudar rapidamente devido ao surgimento de legislações em países importadores de carne de frango brasileira⁵⁷, visto que o Brasil é o primeiro exportador mundial dessa proteína e o segundo maior produtor⁷³. Fica evidente a importância e a necessidade de que se haja estudos e levantamentos no sentido de estimar a prevalência desse patogênio devido a sua importância em saúde pública.

2.3. Campilobacteriose

Doenças de origem alimentar são um agravo de implicação mundial, pela amplitude dos processos envolvidos para disponibilização dos alimentos e pelo reflexo direto à saúde pública. Considerando as diferentes matrizes alimentares de origem vegetal e animal, pode-se apontar que qualquer estágio do processo (iniciando-se na plantação das lavouras, no alojamento dos animais e finalizando no consumo) está exposto ao risco de

contaminação, seja de cunho ambiental, por linhas de processamento do alimento, por manipuladores ou relativos ao próprio alimento⁶⁰.

Os principais patógenos envolvidos nesses quadros clínicos são as espécies classificadas como termotolerantes, sendo portanto *Campylobacter jejuni*, *C. coli*, *C. lari* e *C. upsaliensis*^{5, 74}. *Campylobacter jejuni* é responsável por aproximadamente 90% dos casos humanos, seguido de *Campylobacter coli*, responsável pela maioria dos casos restantes^{32, 75}.

As principais fontes de infecção são leite cru, água e carnes contaminadas, destacando-se a carne de frango, que é considerada a principal fonte de campilobacteriose humana^{6, 76, 77}. Na União Europeia (UE), estimou-se em 2015 que 30% das infecções humanas estivessem associadas ao manuseio e consumo de carne de aves⁷⁸.

As aves são consideradas importantes reservatórios e fonte de transmissão deste patógeno aos humanos, pois seu trato gastrointestinal oferece condições adequadas, principalmente térmicas, para a sobrevivência e disseminação dessa bactéria⁷⁹. Esse microrganismo pode estar presente em grande quantidade no conteúdo intestinal de aves, resultando em contaminação cruzada de carcaças de frango nas áreas de processamento. *Campylobacter* são consideradas organismos comensais que estabelecem colonização persistente sem sinal clínico visível, em diversas espécies de aves, como galinhas, perus, patos, codornas e avestruzes, além de aves silvestres^{8, 80}.

A campilobacteriose humana geralmente se desenvolve de um a cinco dias após a exposição e é caracterizada por diarreia sanguinolenta, febre, cólicas abdominais e vômitos com duração de aproximadamente uma semana. A infecção por *C. jejuni* também vem sendo associada ao desenvolvimento de condições autoimunes, como a afecção neuromuscular conhecida como síndrome de Guillain-Barré (GBS), uma neuropatia desmielinizante grave, que ocorre aproximadamente em 3 a cada 10.000 casos de campilobacteriose^{4, 81}. As infecções por *Campylobacter* são mais comuns em grupos populacionais como crianças menores de 4 anos de idade, adultos entre 20 e 40 anos e idosos acima de 75 anos⁸²⁻⁸⁴.

A sintomatologia gastrointestinal dessa doença é particularmente perigosa para crianças pequenas, pessoas idosas e imunossuprimidas que apresentam maior potencial de desidratação e perda de nutrientes, como sódio e proteínas, como consequência do quadro diarréico⁸⁵.

Dentre as doenças emergentes, consta a campilobacteriose, considerada a gastroenterite bacteriana de origem alimentar mais comumente notificada nos países desenvolvidos em 2015⁷⁸. Tanto a incidência quanto a prevalência de campilobacteriose aumentaram a partir de 2005 nos países desenvolvidos e em desenvolvimento⁴. Houve aumento significativo no número de casos entre os países membros desse bloco econômico entre 2008 e 2017. Em 2017, relatou-se campilobacteriose humana em 27 países membros da União Europeia com 246.158 casos confirmados, resultando em uma taxa de notificação de 64,8 casos por 100.000 habitantes. Entretanto, o aumento do número de casos em alguns países pode tanto demonstrar mudanças na exposição, como também melhorias nos sistemas de vigilância⁷⁴. Acredita-se, no entanto, que o número real de casos seja de cerca de nove milhões a cada ano. O custo da campilobacteriose para os sistemas públicos de saúde e a perda de produtividade dentro da União Europeia foi estimado pela EFSA em cerca de 2,4 bilhões de euros por ano⁸⁶.

Nos Estados Unidos, o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) estimou que anualmente mais de 1,3 milhão de pessoas desenvolvam sintomas relacionados a infecções por *Campylobacter*. A maioria dos casos não faz parte de surtos reconhecidos e ocorrem em maior parte no verão⁵⁸. De acordo com relatório da *FoodNet*, 2015-2018⁸⁷, a incidência de infecção por *Campylobacter* nos Estados Unidos em 2018, foi de 19,5 casos a cada 100.000 habitantes, superando a incidência de infecção por *Salmonella*, seguida por STEC, *Shigella sp.*, *Vibrio sp.*, *Yersinia sp.*, *Cyclospora sp.* e *Listeria sp.* Comparando os dados obtidos entre os anos de 2015 a 2017, houve aumento de 12% no número de infecções por *Campylobacter* termotolerante.

Dados da África, Ásia e Oriente Médio indicam que a campilobacteriose é endêmica nessas áreas, especialmente em crianças⁴. Estima-se que na África Subsaariana, 3,8 milhões de mortes de crianças menores de 5 anos sejam relatadas anualmente^{66, 88}. *Campylobacter* é um dos patógenos bacterianos mais frequentemente isolados das fezes de bebês com diarreia em vários países em desenvolvimento no continente africano e asiático⁸⁹. De acordo com a OMS, 2015⁹⁰, 40% da carga global de doenças transmitidas por alimentos atinge crianças com menos de cinco anos de idade, sendo a carga mais alta por população observada na África.

Aproximadamente 3500 pacientes sofrem de campilobacteriose a cada ano na Coréia do Sul⁹¹. No Japão, devido à tradição cultural de se consumir carne de frango crua ou mal passada o risco de infecção por *Campylobacter* é alto⁹². A Comissão de Segurança

Alimentar Japonesa⁹³ estimou em 2017 que 150 milhões de pessoas sejam infectadas por essa bactéria anualmente.

Por ser doença considerada autolimitante, geralmente não requer tratamento medicamentoso e, em casos mais graves, antibióticos podem ser administrados⁹⁴. Entretanto, cabe enfatizar que a resistência a bases antimicrobianas é uma realidade, o que tem desfavorecido a terapêutica humana quando necessária⁹⁵⁻⁹⁹. O aumento da resistência antimicrobiana em *Campylobacter* é reconhecido por várias autoridades internacionais, incluindo a OMS, como preocupação emergente de saúde pública¹⁰.

2.4 Resistência a antimicrobianos (RAM)

Estima-se que até o ano 2050 a população mundial alcance 9,8 bilhões de pessoas¹⁰⁰. Por decorrência, o crescimento populacional gera aumento significativo da demanda por alimentos, o que pressiona os sistemas de produção a serem cada vez mais eficientes em quantidade e qualidade¹⁰¹.

Embora o fenômeno da resistência de microrganismos a antimicrobianos possa advir da sua adaptação ao meio ambiente, ele vem sendo acelerado pelo uso inadequado e excessivo desses medicamentos^{102, 103}. Além destes, vários fatores podem ser citados como possíveis aceleradores, como a falta de regulação e supervisão do uso de antimicrobianos, a baixa adesão terapêutica, o uso não terapêutico e disponibilidade de antimicrobianos falsificados ou de qualidade duvidosa^{103, 104}.

As consequências da resistência a antimicrobianos incluem falhas terapêuticas que contribuem para aumento da mortalidade, doenças mais severas, perdas produtivas e redução dos meios de subsistência e da segurança alimentar e dos alimentos¹⁰³. O impacto indireto inclui custos mais elevados para tratamento e cuidados de saúde. Consequentemente, minimizar o surgimento e a disseminação de microrganismos resistentes e multirresistentes requer esforço coordenado, multisectorial e multinacional¹⁰⁵.

Nos países em desenvolvimento, os patógenos resistentes são comumente encontrados em animais de produção, produtos derivados e ambientes agroindustriais. Em outra instância, a falta de sistemas de vigilância culmina em menor registro e dados subestimados sobre o nível desses patógenos nessas fontes de contaminação¹⁰⁶.

O surgimento e disseminação de microrganismos resistentes a antimicrobianos é um grande risco aos ganhos obtidos em saúde pública ao longos dos anos¹⁰⁷. Esse risco é particularmente alto em países nos quais não se tem legislação adequada, capaz de fiscalizar e regular o uso desses fármacos, além de uma vigilância regulatória capaz de detectar falhas nos sistemas de monitoramento. Normalmente, nesses países, as medidas de prevenção e controle dos mecanismos de resistência antimicrobiana também são fracas ou inadequadas¹⁰³. De acordo com a Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE), cerca de metade dos países não possuem legislação estruturada sobre o uso de antibióticos¹⁰⁸.

O *Food and Drug Administration* emitiu um relatório no ano de 2016, no qual afirma que os animais destinados à alimentação humana consumiram aproximadamente 14 mil toneladas de antimicrobianos de relevância à saúde humana, sendo que a maior parte desses compostos tem como princípio ativo a tetraciclina, cerca de 5,8 mil toneladas de tetraciclina, somente nos Estados Unidos¹⁰⁹. A OMS estimou em 2012 que o consumo de antimicrobianos por animais foi o dobro do consumido por humanos¹¹⁰.

A responsabilidade sobre o crescente número de casos relatados de microrganismos resistentes a antimicrobianos é compartilhada entre os setores humanos e veterinários e é necessário que seja enfrentado de forma multisetorial para que se obtenha resposta amplificada e coordenada de todas as áreas envolvidas. Dessa forma, surgiu uma colaboração entre a Organização Mundial de Sanidade Animal (OIE), a agência da Organização das Nações Unidas destinada a Alimentação e a Agricultura (FAO), e a OMS. Esses organismos internacionais uniram-se e baseado no conceito *One Health* (Uma Saúde) para reconhecer as necessidades e desafios de cada setor e impulsionar o desenvolvimento de políticas e ferramentas, que auxiliem os países membros no combate a RAM e melhoria da biosseguridade em todos os níveis^{105, 111}.

One Health ou Saúde Única é o termo usado para descrever o princípio que reconhece que a saúde humana e animal estão interligadas e são indissociáveis. Abordagem para o meio ambiente como elo entre humanos e animais evidencia a fonte potencial de novos microrganismos resistentes⁵⁷.

De acordo com a EFSA¹¹², isolados de origem humana de *Campylobacter* apresentaram alta resistência à ciprofloxacina e às tetraciclinas. A resistência às fluoroquinolonas, como a ciprofloxacina, é em tal grau elevada em *Campylobacter* em

alguns países do continente europeu que esses antimicrobianos não são eleitos para o tratamento de casos graves de campilobacteriose¹¹².

O *Center of Disease Control (CDC)*¹¹³ estimou em 2013 que *Campylobacter* resistente a antimicrobianos causem por ano cerca de 310.000 infecções por ano somente nos Estados Unidos. Além disso, de 1997 a 2011 houve aumento de 12% nos casos de resistência a ciprofloxacina em *Campylobacter* nesse mesmo país. As infecções causadas por patógenos resistentes custam mais aos cofres públicos por serem afecções que normalmente demoram mais a serem solucionadas. A rota de origem alimentar é a principal via de transmissão de bactérias resistentes e genes de resistência de animais para humanos, apesar de existirem outras vias de transmissão¹¹⁴.

O’hara et al¹¹⁵ realizaram um estudo em Londres que comprovou que a bacteremia por *Campylobacter* continua sendo uma causa rara, mas significativa, de morbidade com uma baixa mortalidade associada. A resistência à ciprofloxacina aumentou durante o período do estudo, com 35% dos isolados sendo resistentes em geral, em comparação com apenas 3% exibindo resistência a macrolídeos. Apesar de uma minoria de pacientes recebendo antibioticoterapia empírica apropriada, a mortalidade geral foi de apenas 7%. Relatos como o de Spapen et al¹¹⁶, têm vinculado infecções por *Campylobacter* a quadros de cardiomiopatia humana.

O plano de ação global sobre resistência antimicrobiana, criado em 2015, pela OMS, baseia-se em cinco objetivos visando solucionar ou pelo menos diminuir o número de casos associados aos patógenos resistentes existentes. São eles: melhorar a compreensão sobre a resistência antimicrobiana através de educação e comunicação eficazes; ampliar o conhecimento sobre o assunto através de vigilância e pesquisa; reduzir o número de casos através de ações eficazes de higiene, prevenção e saneamento; racionalizar o uso de antimicrobianos na saúde humana e animal; aumentar o investimento em novos medicamentos, métodos e técnicas de diagnóstico mais rápidos e eficazes, vacinas e outras intervenções¹¹¹.

Dessa forma, as plantas e outras matrizes de origem natural têm sido historicamente utilizadas como fontes de substâncias antimicrobianas naturais para o tratamento de diversas doenças¹². Diversos estudos vêm sendo desenvolvidos visando o isolamento e identificação de agentes antimicrobianos provenientes de extratos vegetais e outros produtos naturais, com atividade comparada a dos tradicionalmente utilizados.

Porém, com menor toxicidade, muitas vezes mais eficazes contra a resistência de microrganismos patogênicos e com um menor impacto ambiental¹¹⁷.

A eficácia de extratos de fontes naturais vem sendo comprovada contra uma ampla diversidade de microrganismos multirresistentes a antimicrobianos convencionais isolados de diferentes origens, demonstrando a importância do desenvolvimento de pesquisas acerca do seu potencial como alternativa ao uso dos fármacos antimicrobianos convencionais¹¹⁸⁻¹²⁵.

2.4 Própolis

Em 2016, Nothias et al.¹²⁶ discorreram sobre a necessidade de investigação de produtos naturais, bem como sobre as suas potencialidades uma vez que a resistência a antimicrobianos é de cunho global. Entende-se por própolis o produto oriundo de substâncias resinasas, gomosas e balsâmicas, colhidas pelas abelhas, de brotos, flores e exsudados de plantas, nas quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen¹⁴. Ela pode apresentar variações na coloração e consistência e é utilizada pelas abelhas para a defesa da colmeia e proteção contra insetos e microrganismos¹³. As abelhas também a utilizam para estreitar a entrada da colmeia, a fim de impedir invasores e diminuir a entrada de correntes de ar, além de recobrir buracos e fendas, e imobilizar intrusos mortos pesados demais para serem removidos, evitando a proliferação de microrganismos patogênicos¹²⁷. No geral, a própolis é considerada um produto essencial para a imunidade da colônia de abelhas^{128, 129}.

A própolis têm alcançado destaque no mercado nacional e internacional devido à sua composição química e propriedades biológicas¹⁸. O Brasil ocupa a terceira posição como maior produtor mundial de própolis e produz aproximadamente 150 toneladas por ano. Dois terços do total são destinados à exportação. O país que mais importa esse produto do Brasil é o Japão¹³⁰. Dados da Federação de Apicultores de Minas Gerais revelam que a própolis produzida no estado chegou a ser considerada a melhor do mundo no mercado japonês, onde o quilograma do produto chegou a custar US\$ 200 nos anos 2000¹⁸.

Park et al.¹²⁷, classificaram em 12 grupos as própolis brasileiras encontradas e coletadas nas diferentes regiões do país, usando como parâmetro as diferentes colorações

apresentadas pelos seus extratos. Esta classificação foi feita com base no perfil químico obtido pelas técnicas de espectrofotometria de absorção na região UV-visível e cromatografia líquida de alta eficiência, bem como, pela atividade antimicrobiana e antioxidante de cada material analisado. De acordo com essa divisão, cinco própolis são produzidas na região sul do Brasil (grupos 1 ao 5), seis na região nordeste (grupo 6 ao 11) e uma na região sudeste (grupo 12).

Anos depois desta classificação, uma nova própolis foi encontrada no nordeste brasileiro, em Maceió – Alagoas, classificada como pertencente a um novo grupo, pois possuía a coloração avermelhada¹³¹. Dessa forma, o Brasil possui atualmente 13 grupos diferentes de própolis classificadas e baseadas em características físico-químicas, composição de fitoquímicos e origem botânica^{132, 133}.

2.4.1 Origem Botânica e Composição química

A origem botânica da própolis determina a variação de sua composição físico-química. A fonte vegetal utilizada pelas abelhas em países da América do Sul é diferente da encontrada em outros países, o que torna a composição química da própolis brasileira diferenciada¹³. A correlação do tipo de própolis com a sua origem botânica é algo difícil de ser realizado devido à grande diversidade da flora brasileira, e dessa forma, apenas alguns tipos possuem origem botânica identificada¹²⁷. Além disso, no país, existem muitas plantas que podem ser visitadas pelas abelhas como fontes de própolis, e a sua composição química pode diferir dependendo da localização geográfica¹³⁴.

A própolis brasileira mais popular é a própolis verde, originária da planta *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae), uma planta nativa do Brasil, conhecida como alecrim do campo^{135, 136}. Os extratos aquosos da própolis verde demonstraram ser ricos em derivados de ácido clorogênico, ácido *p*-cumárico e ácido cafeoilquinóico, enquanto os extratos etanólicos contêm artepilina C, ácido *p*-cumárico e derivados do ácido cafeoilquinóico¹³⁷. Artepilina C é o principal biomarcador da própolis verde brasileira e considerado atualmente como composto de grande interesse para a indústria farmacêutica devido à sua grande variedade de propriedades biológicas como potencial anti-inflamatório, antioxidante e antimicrobiano¹³⁸⁻¹⁴⁰.

Com relação à própolis vermelha brasileira, a última a ser identificada e classificada, tem como origem botânica o exsudato resinoso de *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como rabo de bugio. Dessa forma, a produção dessa própolis é comum na região de manguezais devido à presença dessa planta^{131, 141}. Trabalhos desenvolvidos com essa própolis têm demonstrado grande potencial biológico, incluindo a atividade antimicrobiana, contra vários microrganismos^{29, 142, 143}.

No que diz respeito à própolis vermelha, sua atividade biológica se deve principalmente às isoflavonas, que atuam sinergicamente com outros compostos. A formononetina é considerada uma das principais isoflavonas presentes nas amostras dessa própolis. Outros compostos foram identificados nas frações e extratos da própolis vermelha brasileira, como vestitol, neovestitol, biochantina A e liquiritigenina, também são considerados marcadores importantes e têm sido associados a diferentes efeitos biológicos. Dentre eles a biochantina A é considerada o principal marcador desse tipo de própolis^{29, 144}

A composição química da própolis depende de vários fatores, incluindo o tempo de coleta, origem geográfica, flora no local de coleta, espécies de abelhas e métodos de extração para obtenção do extrato^{13, 22, 143}. Até agora, mais de 420 constituintes químicos foram identificados nas própolis de diferentes regiões^{21, 145}. A maioria das amostras de própolis compartilham semelhanças consideráveis em sua natureza química. Em geral, a própolis bruta é composta por 50% de resina e bálsamo vegetal (que contém os compostos biologicamente ativos), 35% de ceras (principalmente cera de abelha, algumas ceras vegetais), 5% a 10% de óleos aromáticos, 5% de pólen e outras substâncias menores, incluindo detritos orgânicos^{19, 146}.

Os principais compostos bioativos presentes na própolis são os compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos e os seus ésteres), terpenoides e esteroides^{146, 147}.

2.4.2 Propriedades biológicas

As propriedades biológicas da própolis podem ser atribuídas a uma variedade de compostos químicos incorporados na mistura de resina. A composição química e as atividades biológicas da própolis podem variar de acordo com o método de extração utilizado¹⁴³.

Extratos de uma mesma planta, obtidos a partir de extrações e solventes diferentes tem potencial de ação antibacteriana diferentes. Normalmente, extratos etanólicos apresentam potencial antimicrobiano maior quando comparados com extratos hidroalcoólicos ou aquosos, por conta dos compostos biodisponibilizados por meio dessa extração¹⁴⁸.

Os flavonoides são considerados os principais compostos responsáveis pelos efeitos benéficos da própolis. Esses compostos fenólicos provenientes de plantas atuam em vários processos fisiológicos e exercem função antioxidante e antimicrobiana¹²⁰. As benzofenonas, que são compostos fenólicos que apresentam alta atividade antimicrobiana, antitumoral e antioxidante, também estão entre os compostos químicos detectados e isolados a partir de própolis encontradas, principalmente em regiões tropicais¹²¹.

Os extratos da própolis têm apresentado diversas atividades farmacológicas, como propriedades hipotensoras^{137,149}, imunomoduladoras¹⁵⁰⁻¹⁵², anti-tumorais^{153,154}, antibacterianas^{29, 155}, antivirais^{156, 157}, antifúngicas^{158, 159}, anti-inflamatórias¹⁶⁰ e antiparasitárias¹⁴²; que são atribuídas à sua complexa composição química, principalmente pela presença de fitoquímicos oriundos do metabolismo secundário das plantas¹⁶¹.

2.5 Justificativa

O aumento da resistência a antimicrobianos por isolados de *Campylobacter* de origem alimentar nos últimos anos, tem chamado a atenção ao redor do mundo. Sendo cada vez mais necessário que se busque alternativas viáveis ao uso desses fármacos na inibição e eliminação desses patógenos. Nesse contexto, os extratos naturais são uma alternativa a ser pesquisada, entre eles os extratos de própolis, principalmente aqueles oriundos de países tropicais pelo potencial farmacológico dos seus componentes. O que justifica a pesquisa realizada.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Quantificar compostos bioativos e avaliar o efeito antimicrobiano de extratos de própolis verde e vermelha sobre *Campylobacter* termotolerantes isolados de alimentos de origem avícola.

3.2 Objetivos específicos

Determinar teores de compostos fenólicos, flavonóides e radicais antioxidantes dos extratos de própolis verde e própolis vermelha;

Avaliar ação inibitória de extratos de própolis verde e vermelha sobre culturas de coleções e *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari* isolados de carcaças de frango.

4. HIPÓTESES

Os extratos de própolis verde e vermelha possuem efeito antimicrobiano sobre *Campylobacter* termotolerante, em concentrações pré-definidas.

Os extratos de própolis verde e vermelha não possuem efeito antimicrobiano sobre as espécies de *Campylobacter* termotolerante, em concentrações pré-definidas.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Obtenção dos extratos

As própolis que compuseram o estudo foram duas, verde e vermelha, originárias dos estados do Paraná, com obtenção em 2013, e da Bahia, com obtenção em 2017, respectivamente. A partir das própolis mencionadas foram realizadas extrações por dois métodos: extração assistida por ultrassom e a convencional, ou etanólica, totalizando quatro extratos, conforme disposto no Quadro 1.

QUADRO 1 – Descrição das própolis, tipo de extração e localidade de origem

Tipo de própolis	Tipo de extração	Localidade	Ano	Código
Verde	Ultrassônica	Paraná	2013	VeUP13
	Etanólica	Paraná	2013	VeEP13
Vermelha	Ultrassônica	Bahia	2017	VoUC17
	Etanólica	Bahia	2017	VoEC17

De forma geral, um total de 2 g de cada amostra de própolis (verde ou vermelha) foram homogeneizadas com 25 mL de etanol a 80% em frasco de vidro e colocadas em um equipamento de ultrassom (Lauda, Brasil) com uma potência de 400 W, frequência de 60 kHz, temperatura de 50 °C por 80 minutos. Para a extração etanólica convencional foi aplicado o processo industrial utilizado para obtenção de extratos de própolis no Brasil. Assim, 2 g de cada amostra de própolis (verde ou vermelha) foram submetidas a infusão com etanol a 80% por sete dias (25 °C). Para a extração assistida por ultrassom foi utilizada a metodologia de Chen et al.¹⁶² e Reis et al.²²

Os extratos obtidos pelos dois métodos foram centrifugados em centrífuga de bancada a 20.000 RPM por 20 min a 4 °C e o sobrenadante obtido foi filtrado. Por fim, os extratos foram secos a temperatura de 40 °C em estufa com circulação de ar para evaporação completa do solvente.

5.2 Identificação de compostos bioativos dos extratos de própolis

5.2.1 Determinação dos compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais dos extratos de própolis foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteau descrito por Woisky e Salatino¹⁶³ usando ácido gálico como padrão. O etanol (95%) foi usado para dissolver os extratos, a fim de se obter uma concentração de 0,1 mg/mL. Em seguida, retirou-se 0,5 mL da alíquota do extrato e misturou-se com 2,5 mL de solução aquosa de Folin-Ciocalteau (10%) e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A solução foi colocada num banho com regulação térmica a 50° C durante 5 minutos (Marconi, M127, Brasil), e depois a absorbância foi medida num espectrofotômetro (Femto-700 plus) a 765 nm, utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm e volume de 3,5 mL. Os resultados das concentrações de compostos fenólicos totais foram comparados a uma curva padrão de ácido gálico (equivalentes de ácido gálico) (mgGAE.g^{-1}) nas mesmas condições. Todas as análises foram executadas em triplicata.

5.2.2 Determinação do teor de flavonoides totais

A determinação de flavonoides dos extratos foi realizada de acordo com o método colorimétrico do cloreto de alumínio¹⁶⁴. Inicialmente, 2,0 mL de cada extrato (0,3 mg/mL) foram transferidos para o tubo de ensaio e adicionados 2,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl_3) a 2%. As amostras foram homogeneizadas e deixadas sob o abrigo da luz por um período de 30 min. A absorbância das amostras foi medida em um espectrofotômetro (Femto - 700 plus) a 415 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando soluções conhecidas de padrão de quercetina para elaborar uma curva padrão. Além disso, uma amostra em branco foi preparada nas mesmas condições e a quantidade de teor de flavonoides foi expressa como equivalentes de quercetina (EQ) (mg EQ/g). Todas as análises foram executadas em triplicata.

5.2.3 Determinação da atividade antioxidante total pelo radical livre DPPH

A capacidade antioxidante dos extratos das própolis foi determinada utilizando-se 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH), de acordo com a metodologia descrita por Molyneux¹⁶⁵. Os extratos foram diluídos na concentração de 50 µg.mL⁻¹ em triplicatas. Em seguida, 1,0 mL de cada diluição foi transferido para um tubo de ensaio contendo 3,0 mL de solução etanólica de DPPH (0,004%). Após 30 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente, mediu-se a redução do radical livre DPPH lendo a absorbância em um espectrofotômetro (Femto-700 plus) a 517 nm. Procedimento similar foi realizado substituindo a amostra de extrato por etanol, obtendo dessa forma o branco. A porcentagem de inibição do radical DPPH foi calculada através da equação abaixo:

$$\% \text{ de sequestro} = 100 - [(\text{média das absorbâncias} \times 100) / \text{absorbância em branco}] \text{ (Equação 1)}$$

5.2.4 Diluições utilizadas dos extratos de própolis

A diluição dos extratos de própolis foi feita a partir da pesagem da quantidade de material a ser utilizado e da adição de etanol 98% na quantidade suficiente para obtenção da concentração inicial a ser testada (100 mg/mL). A partir desta concentração, outras dez concentrações foram obtidas por diluição seriada. Desta forma, as concentrações referiram-se a 0,097 mg/mL, 0,195 mg/mL, 0,391 mg/mL, 0,781 mg/mL, 1,562 mg/mL, 3,125 mg/mL, 6,25 mg/mL, 12,5 mg/mL, 25 mg/mL, 50 mg/mL e 100 mg/mL.

5.3 Bactérias de coleções e isolados de campo

Quatro cepas referências subsidiaram os ensaios com bactérias padronizadas de coleções específicas do Instituto Adolfo Lutz (IAL) e da coleção americana *American Type Culture Collection* (ATCC). Compuseram os ensaios, duas cepas do gênero *Campylobacter* e duas do gênero *Salmonella*.

Com relação a *Campylobacter* spp. foi utilizada *Campylobacter coli* cedida pelo Instituto Adolfo Lutz e *Campylobacter jejuni* (ATCC 33291). Referente ao gênero *Salmonella*, foram utilizadas *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076) e *Salmonella Typhimurium* (ATCC 14028).

Em adição aos ensaios apontados anteriormente e considerando a variabilidade fenotípica e genotípica identificada em uma mesma espécie e entre espécies de *Campylobacter* termotolerantes extraídos de alimentos, 25 isolados de campo foram selecionados, todos provenientes de carcaças de frangos e armazenados em temperatura de 80 °C negativos. Três espécies e um isolado com classificação para gênero compuseram os microrganismos de campo avaliados, conforme especificado no Quadro 2.

QUADRO 2 - *Campylobacter* termotolerantes isoladas de carcaças de frango que subsidiaram a investigação para ação dos extratos de própolis

Espécie	Quantidade de isolados	Identificação adotada
<i>Campylobacter jejuni</i>	12	CJ - 1 CJ - 2 CJ - 3 CJ - 4 CJ - 5 CJ - 6 CJ - 7 CJ - 8 CJ - 9 CJ - 10 CJ - 11 CJ - 12
<i>Campylobacter coli</i>	11	CC - 1 CC - 2 CC - 3 CC - 4 CC - 5 CC - 6 CC - 7 CC - 8 CC - 9 CC - 10 CC - 11
<i>Campylobacter lari</i>	01	CL
<i>Campylobacter</i> spp.	01	C

5.4 Fluxograma da atividade experimental

Visando facilitar o entendimento das etapas que fizeram parte da atividade experimental, optou-se por elaborar fluxograma antecedendo a descrição e explicação de cada procedimento.

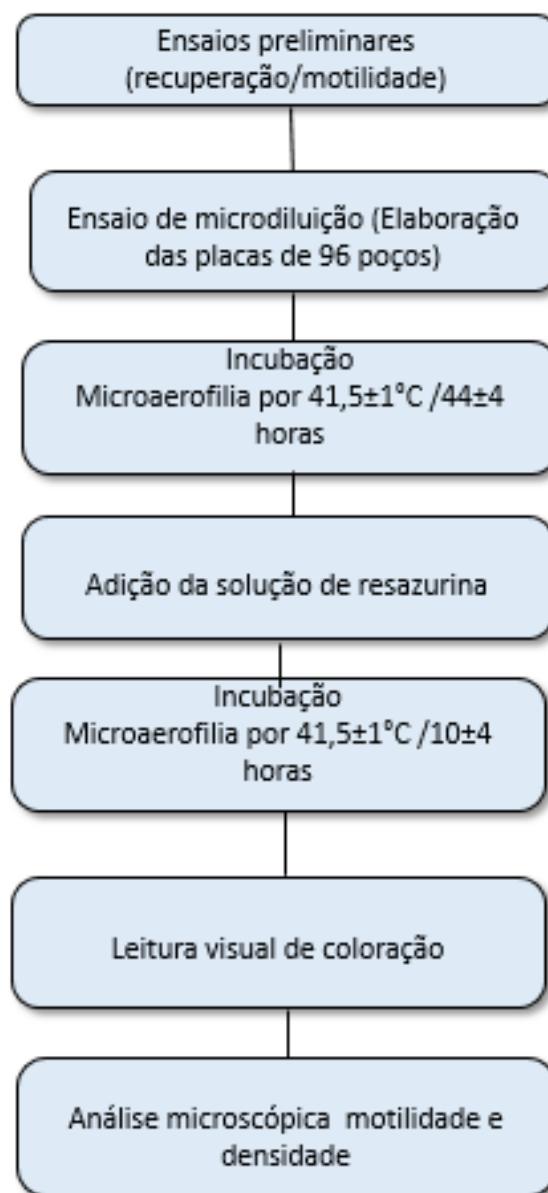


FIGURA 1 – Etapas da atividade experimental

5.4.1 Preparação dos inóculos bacterianos

a) Ensaio de recuperação

As culturas bacterianas foram descongeladas em temperatura ambiente, e semeadas em ágar Charcoal Cefoperazona Desoxicolato Modificado (mCCDA) (OXOID®) suplementado com antibióticos e em ágar CampyFood ID (BIOMÉRIEUX®). Todas as placas foram incubadas em microaerofilia a $41,5\pm1^{\circ}\text{C}$ / 44 ± 4 horas. Para confirmação de viabilidade de culturas adotou-se o critério de observação de crescimento característico de colônias nos dois tipos de ágar. Esses testes seguiram as considerações da ISO 10272-1:2017¹⁶⁶.

b) Ensaio de confirmação de viabilidade

Foram preparadas suspensões em solução aquosa peptonada a 0,1% m/v a partir das colônias obtidas do ágar mCCDA, turbidez de 0,5 da escala de McFarland (bioMérieux), aproximadamente $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.

A partir da homogeneização dessa solução aquosa foram preparadas lâminas e observada a motilidade de estirpes de CJ/CC/CL/C, ocasião em que houve a manutenção ou exclusão dos isolados. Esses testes seguiram as considerações da ISO 10272-1:2017¹⁶⁶.

5.4.2 Preparação e utilização da solução de resazurina

A solução de resazurina a 0,1 % foi preparada a partir da adição de água destilada estéril ao reagente em pó imediatamente antes da sua adição às placas de 96 poços^{168, 169}. Após a adição desse reagente aguardou-se aproximadamente 12 horas em incubação em microaerofilia. Após este período de tempo a leitura visual correspondeu à classificação de inatividade bacteriana para a coloração azul e atividade para a coloração rosa/avermelhada. A resazurina por ser um corante que atesta a presença de crescimento microbiano por sua característica de indicador de reações de oxirredução, permite determinar a menor concentração inibitória associada aos extratos.

5.5 Ensaios de microdiluição

Para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) foi utilizado o método de microdiluição em placas de 96 poços descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*^{167, 168}. A partir do inóculo bacteriano padronizado transferiu-se 15 µL da solução aquosa salina para 15 mL de caldo Bolton suplementado e procedeu-se a homogeneização. Em seguida transferiu-se 140 µL do caldo para cada poço da placa de 96 poços. A Figura 2 refere-se à esquematização da adição dos inóculos e das concentrações de própolis, sem a adição da resazurina.

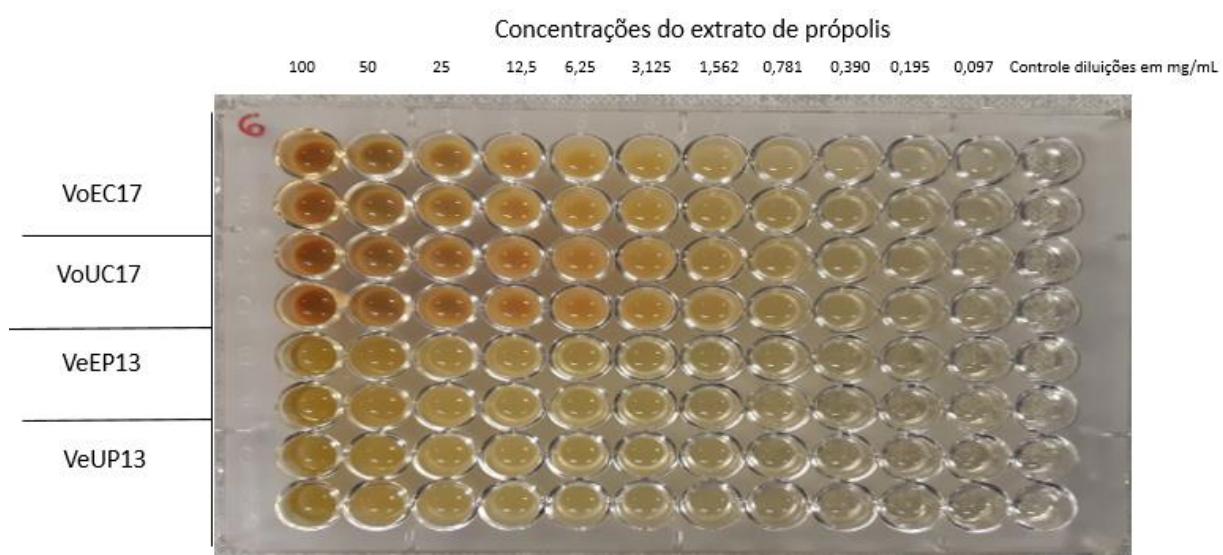


FIGURA 2 – Concentrações extrato de própolis etanólico vermelho (VoEC17) de Canavieiras do ano de 2017, extrato obtido por extração assistida por ultrassom de própolis vermelha (VoUC17) de Canavieiras do ano de 2017, extrato etanólico de própolis verde (VeEP13) do Paraná do ano de 2013 e extrato obtido por extração assistida por ultrassom de própolis verde (VeUP13) do Paraná do ano de 2013. Colunas de 1 a 11 correspondem às diluições de cada extrato 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,781; 0,390 e 0,195 e 0,097 mg/mL, respectivamente. A coluna 12 foi destinada ao controle da solução de resazurina a 0,01% (presença do microrganismo sem adição do extrato da própolis).

Após a adição do inóculo bacteriano, procedeu-se a adição da própolis em sua maior concentração (100 mg/mL). Em todas as placas seguiu-se o mesmo padrão: nas linhas A e B adicionou-se o extrato etanólico de própolis vermelha, nas linhas C e D adicionou-se o extrato ultrassônico de própolis vermelha, nas linhas E e F adicionou-se o extrato etanólico de própolis verde e nas linhas G e H adicionou-se o extrato ultrassônico

de própolis verde. Adicionou-se 140 µL do respectivo extrato de própolis no primeiro poço de cada linha e procedeu-se a homogeneização e diluição seriadas a partir da transferência de 140 µL para os poços seguintes até o poço 11.

Nenhum poço da coluna 12 recebeu o extrato de própolis pois foi destinado a ser utilizado como poço controle e por isso recebeu nesse momento somente o inóculo bacteriano. Cada isolado foi testado em uma placa. Observa-se que as linhas A e B, C e D, E e F e linhas G e H compuseram duplicatas dos ensaios de cada própolis utilizado.

Todas as placas foram incubadas em microaerofilia a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 44 ± 4 horas. Após esse período procedeu-se a adição de 30 µL de solução de resazurina em cada poço da placa de 96 poços, inclusive no controle bacteriano (coluna 12) e incubou-se novamente em condições de microaerofilia a $41,5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 10 ± 4 horas para que fosse possível a metabolização desse reagente. A solução de resazurina em sua forma original apresenta-se na coloração azul escura, nos poços nos quais a cor do corante é alterada, significa que a atividade microbiana é existente e consequentemente o extrato não foi capaz de inativar o microrganismo.

5.6 Microscopia óptica por contraste de fase

Foram elaboradas lâminas a partir de cada isolado em todas as concentrações de exposição de cada extrato de própolis testado, para análise de motilidade em microscópio óptico. Foi depositado a alíquota de 8 µL pós incubação e pós adição do reagente colorimétrico sobre a superfície de uma lâmina de vidro e recoberto com uma lamínula. Observando motilidade dos isolados com auxílio de microscópio óptico com lente de aumento de 40x.

Desenvolveu-se uma escala própria para classificação de motilidade posteriormente transformada em um escore para melhor interpretação dos dados. A presença ou ausência de motilidade foi definida pelas siglas M (motilidade) e NM (bactérias não móveis) visualmente definido pela presença de cocos (Figura 3). A densidade foi quantificada por número de símbolos (+) e (-) e correlacionadas a um escore numérico (Tabela 1).

TABELA 1- Padronização entre a quantificação da densidade bacteriana e o escore numérico utilizado para a elaboração dos gráficos

Densidade bacteriana	Escore	Classificação
-	0	A
+	1	B
++	2	C
+++	3	D

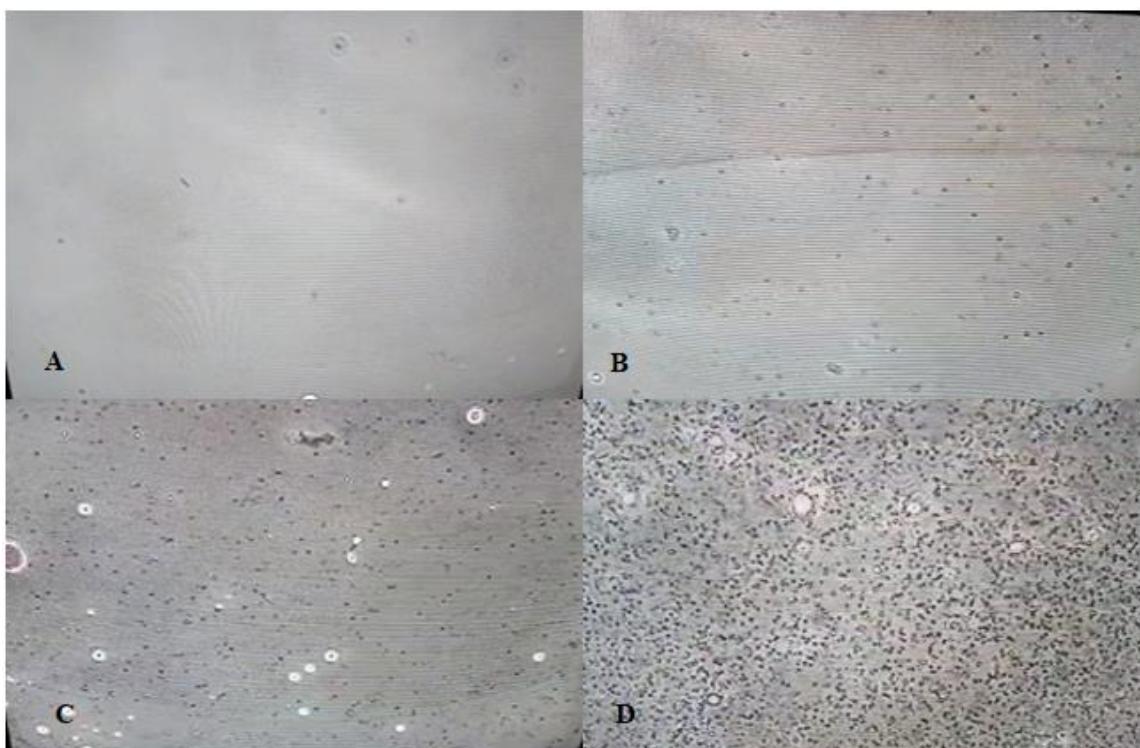


FIGURA 3– Fotografias das imagens obtidos por microscopia óptica. (A) Densidade bacteriana classificada por escala própria como muito baixa (-); (B) Densidade bacteriana classificada por escala própria como baixa (+); (C) Densidade bacteriana classificada por escala própria como média (++) e (D) Densidade bacteriana classificada por escala própria como alta (+++). Aumento de 40 x.

A análise estatística adotada para as comparações dos extratos/métodos de extração, com relação aos teores de compostos fenólicos, flavonoides e percentual de DPPH referiu-se ao Teste de Tukey, nível de confiança a 95%.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 2 estão descritas as composições dos extratos de própolis.

TABELA 2 - Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais (mg EAG/g), flavonoides (mg EQ/g) e da atividade antioxidante por DPPH (%) dos quatro extratos.

Extratos	Compostos Fenólicos (mg EAG/g)	Flavonoides (mg EQ/g)	DPPH (%)
VeEP13	188,46±0,48 ^c	40,35±0,26 ^c	56,88±0,21 ^a
VeUP13	301,76±0,65 ^a	31,08±0,57 ^c	57,27±1,61 ^a
VoEC17	235,42±0,96 ^{bc}	155,56±0,64 ^a	70,61±0,01 ^b
VoUC17	249,52±2,24 ^{ab}	133,56±1,38 ^b	70,40±0,23 ^b

Legenda: VeEP13 - extrato etanólico de própolis verde do Paraná, 2013 e VeUP13 - extrato obtido por extração assistida por ultrassom de própolis verde do Paraná, 2013; VoEC17 - extrato de própolis etanólico vermelho de Canavieiras, 2017; VoUC17 - extrato obtido por extração assistida por ultrassom de própolis vermelha de Canavieiras, 2017. Valores com a mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p < 0,05$) usando o teste Tukey, nível de confiança de 95%.

Analisando o doseamento dos extratos, observou-se que própolis verde possui menor concentração de flavonoides quando comparado à própolis vermelha. Com relação ao método de extração percebe-se que os extratos de própolis verde possuem aproximadamente três a quatro vezes menor quantidade desse composto que a própolis vermelha. Desta forma, visto que os flavonoides são compostos fenólicos que possuem diferentes atividades biológicas, entre elas a ação antioxidantante^{169,170}, o aumento da sua concentração nos extratos de própolis é um indicativo de inibição da velocidade de oxidação, reduzindo dano celular causado por espécies reativas de oxigênio (ERO) e espécies reativas de nitrogênio (ERN).

Destaca-se também a diferença entre a capacidade antioxidantante dos extratos de própolis verde e vermelha, item importante a ser analisado, uma vez que a quantidade de DPPH corresponde ao percentual do composto que inibe a oxidação.

Importante ressaltar que a atividade biológica da própolis se deve à ação sinérgica de todos os seus compostos e não somente um grupo específico de compostos químicos^{171,172}. Soma-se a isto o fato de que a composição é interdependente da origem botânica, da região, da sazonalidade e dos métodos de extração.

Outro fator relevante é a biodisponibilização dos compostos químicos identificados, considerando o método de extração e a atividade biológica do extrato^{22,173-175}. Extratos etanólicos têm sido mais comumente usados devido ao seu conteúdo em ácidos fenólicos e flavonoides¹⁷⁶. Esse método, entretanto, tem as desvantagens de baixa seletividade e baixo rendimento na extração de compostos de interesse, além de longos períodos de extração, aumentando assim os custos desse processo^{22,173}.

A extração assistida por ultrassom, a assistida por micro-ondas e realizada por fluido supercrítico são alguns métodos que têm sido utilizados visando aumentar a eficiência da extração dos componentes bioativos da própolis^{177,178}. Nesse contexto, a extração assistida por ultrassom representa uma alternativa confiável aos métodos tradicionais de extração e tem sido amplamente aplicada na extração de compostos de diferentes matrizes naturais^{179,180}. Apresenta como principais vantagens: obter compostos de interesse em um tempo mais curto, com rendimentos mais altos e menor consumo de solvente quando comparados aos métodos de extração convencionais^{22,181,182}. O que o torna um método de extração ecologicamente mais interessante, economicamente viável e eficiente¹⁶⁹.

Quanto aos componentes, além dos flavonoides, a própolis contém extensa gama de outros compostos antioxidantes que interagem com os radicais livres, como os polifenois, por exemplo¹⁸³. Ademais, esse trabalho não pesquisou atividade estratificada de bioativos da própolis.

Acrescenta-se que a própolis verde é a única que possui o composto fenólico Artepelin C. Este componente é um marcador com ação relevante considerando as funções biológicas identificadas, entre elas a atividade antimicrobiana, principalmente relacionadas a fungos e bactérias Gram positivas quando avaliados *in vitro*¹⁸⁴.

No quesito da avaliação do efeito antimicrobiano, identificou-se em trabalhos realizados pelo mesmo grupo de pesquisa, que as bactérias Gram-negativas, originárias de culturas de coleções específicas, apresentaram comportamento diferente frente aos mesmos extratos, bem como tiveram comportamento divergente das cepas de campo. Isto pode ser justificado devido a ecologia desses microrganismos e o comportamento frente a ambientes adversos.

As Tabelas 3 e 4 contêm dados relativos ao intervalo de inibição e ausência de inibição dos isolados testados pelo parâmetro do método de microdiluição com indicador de resazurina.

TABELA 3 – Intervalos testados do extrato etanólico (EE) e extrato obtido por ultrassom (EU) de própolis verde, originária do Paraná (2013) sobre isolados de *Campylobacter* termotolerantes identificados em carcaças de frangos

ISOLADO	Extrato etanólico		Extrato ultrassom	
	Intervalo das concentrações de inibição	Intervalo das concentrações sem inibição	Intervalo das concentrações de inibição	Intervalo das concentrações sem inibição
CJ - 1	0,097 – 3,12	6,25 - 100	0,097 – 3,12	6,25 - 100
CJ - 2	0,097 – 6,25	12,50 - 100	0,097 – 25,00	12,50 - 100
CJ – 3	0,097 – 3,12	6,25 - 100	0,097 – 3,12	6,25 - 100
CJ – 4	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097 – 25,00	12,50 - 100
CJ – 5	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CJ – 6	0,097 – 50,00	25,00 - 100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CJ – 7	0,097 – 25,00	50,00 - 100	0,097 – 25,00	12,50 - 100
CJ – 8	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CJ – 9	0,097 – 6,25	12,50 - 100	0,097 – 25,00	12,50 - 100
CJ – 10	0,097 – 6,25	12,50 - 100	0,097 – 25,00	12,50 - 100
CJ – 11	0,097 – 6,25	12,50 - 100	0,097 – 25,00	12,50 - 100
CJ – 12	0,097 – 12,50	25,00 – 100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CC – 1	0,097 – 3,12	6,25 -100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CC – 2	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097 – 12,50	25,00 - 100

TABELA 3 - Intervalos testados do extrato etanólico (EE) e extrato obtido por ultrassom (EU) de própolis verde, originária do Paraná (2013) sobre isolados de *Campylobacter* termotolerantes identificados em carcaças de frangos (continuação)

CC – 3	0,097 – 6,25	12,50 - 100	0,097 – 6,25	12,50 - 100
CC – 4	0,097 – 100	-	0,097 - 100	-
CC – 5	0,781 – 6,25	0,097– 0,390 ; 12,50 - 100	3,12 – 12,5	0,097- 1,56; 25 -100
CC – 6	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097 – 12,50	25,00 -100
CC – 7	0,097 – 6,25	12,50 - 100	0,097 – 6,25	12,50 -100
CC – 8	0,194 – 50,00	0,097; 25,00 - 100	0,097 – 6,25	12,50 -100
CC – 9	0,097 – 6,25	12,50 - 100	0,097 – 6,25	12,50 -100
CC – 10	0,097 – 6,25	12,50 - 100	0,097 – 6,25	12,50 -100
CC – 11	0,097 – 6,25	12,50 - 100	0,097 – 6,25	12,50 -100
CL	0,781 – 6,25	0,097 – 0,395; 12,50 - 100	0,781 – 6,25	0,097 – 0,395; 12,50 - 100
C	3,12 – 12,50	0,097 – 1,56; 25,00 -100	3,12 – 12,50	0,097 – 1,56; 25,00 -100

Legenda: - Não foi possível detectar a concentração inibitória mínima por leitura visual

TABELA 4 - Intervalos testados do extrato etanólico (EE) e extrato obtido por ultrassom (EU) de própolis vermelha, originária da Bahia (2017) sobre isolados de *Campylobacter* termotolerantes identificados em carcaças de frangos

ISOLADO	Extrato etanólico		Extrato ultrassom	
	Intervalo das concentrações de inibição	Intervalo das concentrações sem inibição	Intervalo das concentrações de inibição	Intervalo das concentrações sem inibição
CJ - 1	0,097- 6,25	12,50 -100	0,097 – 3,12	6,25 - 100
CJ - 2	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097- 6,25	12,50 -100
CJ – 3	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097 – 3,12	6,25 - 100
CJ – 4	0,097 – 3,12	6,25 - 100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CJ – 5	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CJ – 6	0,097 – 3,12	6,25 - 100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CJ – 7	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097- 6,25	12,50 -100
CJ – 8	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CJ – 9	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097- 6,25	12,50 -100
CJ – 10	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097- 6,25	12,50 -100
CJ – 11	0,097- 6,25	12,50 -100	0,097- 6,25	12,50 -100
CJ – 12	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CC – 1	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CC – 2	0,097 – 3,12	6,25 - 100	0,097- 6,25	12,50 -100

TABELA 4 - Intervalos testados do extrato etanólico (EE) e extrato obtido por ultrassom (EU) de própolis vermelha, originária da Bahia (2017) sobre isolados de *Campylobacter* termotolerantes identificados em carcaças de frangos (continuação)

CC – 3	0,097- 6,25	12,50 -100	0,097- 6,25	12,50 -100
CC – 4	0,097 – 100	-	0,097 – 100	-
CC – 5	3,12	0,097 – 1,56; 6,25 - 100	3,12 – 6,25	0,097 – 1,56; 12,50 - 100
CC – 6	0,097- 6,25	12,50 -100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CC – 7	0,097- 6,25	12,50 -100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CC – 8	0,097- 6,25	12,50 -100	0,097 - 6,25	12,50 -100
CC – 9	0,097- 6,25	12,50 -100	0,097 - 6,25	12,50 -100
CC – 10	0,097 – 12,50	25,00 - 100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CC – 11	0,097- 6,25	12,50 -100	0,097 – 12,50	25,00 - 100
CL	3,12 – 6,25	0,097 – 1,56; 12,50 -100	0,781 – 6,25	0,097 – 0,395; 12,50 - 100
C	0,781 – 3,12	0,097 – 1,56 ; 6,25 -100	3,12 – 12,50	0,097 – 1,56; 25 - 100

Legenda: - Não foi possível detectar a concentração inibitória mínima por leitura visual

As Tabelas 5, 6, 7 e 8 contêm dados referentes aos ensaios de viabilidade microbiana pelos parâmetros do método de microdiluição com indicador resazurina, classificação da motilidade e densidade microbiana, para os quatro extratos.

TABELA 5- Efeito do extrato de própolis vermelha obtido por extração convencional etanólica, originário de Canavieiras – Bahia, obtido no ano de 2017 (VoEP17) sobre cepas referência e isolados de *Campylobacter* termotolerantes obtidas de alimento de origem avícola

Cepa/isolado	CIM (mg/mL)	Viabilidade microbiana*	Motilidade microbiana**	Densidade microbiana ***
<i>C. coli</i> (IAL)	12,50	-	-	-
<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	50,00	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	3,12	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	6,25	-	-	-
CJ – 1	12,50	Sim	M	++
CJ – 2	25,00	Sim	M	+++
CJ – 3	25,00	Sim	NM	-
CJ – 4	6,25	Sim	M	++
CJ – 5	25,00	Sim	NM	-
CJ – 6	6,25	Sim	M	++
CJ – 7	25,00	Sim	M	+++
CJ – 8	25,00	Sim	M	+++
CJ – 9	25,00	Sim	M	+++
CJ – 10	25,00	Sim	M	+++
CJ – 11	12,50	Sim	M	++
CJ – 12	25,00	Sim	M	+++
CC – 1	12,50	Sim	M	+++
CC – 2	6,25	Sim	M	+++
CC – 3	12,50	Sim	M	++
CC – 4	-	Não	-	-
CC – 5	6,25	Sim	M	++
CC – 6	12,50	Sim	M	+++

TABELA 5- Efeito do extrato de própolis vermelha obtido por extração convencional etanólica, originário de Canavieiras – Bahia, obtido no ano de 2017 (VoEP17) sobre cepas referência e isolados de *Campylobacter* termotolerantes obtidas de alimento de origem avícola. (continuação)

CC – 7	12,50	Sim	NM	++
CC – 8	12,50	Sim	M	+++
CC – 9	12,50	Sim	M	+++
CC – 10	25,00	Sim	M	+++
CC – 11	12,50	Sim	NM	++
CL	12,50	Sim	M	+
C	6,25	Sim	NM	-

Legenda :*alteração de cor compatível com CMI; **escore classificado por visualização microscópica: M: Móvel/ NM: Não móvel; *** escore classificado pela escala de densidade: (-) Densidade bacteriana classificada por escala própria como muito baixa (+) Densidade bacteriana classificada por escala própria como baixa (++) Densidade bacteriana classificada por escala própria como média (+++) Densidade bacteriana classificada por escala própria como alta; - : Não foi possível detectar a concentração inibitória mínima por leitura visual.

TABELA 6 - Efeito do extrato de própolis vermelha obtido por extração assistida por ultrassom, originário de Canavieiras - Bahia, obtido no ano de 2017 (VoUC17) sobre cepas referência e isolados de *Campylobacter* termotolerantes obtidas de alimento de origem avícola.

Cepa/isolado	CIM (mg/mL)	Viabilidade microbiana*	Motilidade microbiana**	Densidade microbiana***
<i>C. coli</i> (IAL)	-	-	-	-
<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	-	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	6,25	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	6,25	-	-	-
CJ – 1	12,50	Sim	M	++
CJ – 2	25,00	Sim	M	++
CJ – 3	25,00	Sim	M	++
CJ – 4	12,50	Sim	M	++
CJ – 5	25,00	Sim	NM	+
CJ – 6	12,50	Sim	M	++
CJ – 7	25,00	Sim	M	+++
CJ – 8	25,00	Sim	M	+++

TABELA 6 - Efeito do extrato de própolis vermelha obtido por extração assistida por ultrassom, originário de Canavieiras - Bahia, obtido no ano de 2017 sobre cepas referência e isolados de *Campylobacter* termotolerantes obtidas de alimento de origem avícola. (continuação)

CJ – 9	25,00	Sim	M	+++
CJ – 10	25,00	Sim	NM	++
CJ – 11	12,50	Sim	M	+++
CJ – 12	25,00	Sim	M	+++
CC – 1	25,00	Sim	M	+++
CC – 2	12,50	Sim	M	++
CC – 3	12,50	Sim	M	++
CC – 4	-	Não	-	-
CC – 5	6,25	Sim	NM	++
CC – 6	25,00	Sim	M	++
CC – 7	25,00	Sim	M	++
CC – 8	12,50	Sim	M	+++
CC – 9	12,50	Sim	M	+++
CC – 10	25,00	Sim	M	+++
CC – 11	25,00	Sim	M	+++
CL	25,00	Sim	NM	-
C	12,50	Sim	M	+++

Legenda :*alteração de cor compatível com CMI; **escore classificado por visualização microscópica: M: Móvel/ NM: Não móvel; *** escore classificado pela escala de densidade: (-) Densidade bacteriana classificada por escala própria como muito baixa (+) Densidade bacteriana classificada por escala própria como baixa (++) Densidade bacteriana classificada por escala própria como média (+++) Densidade bacteriana classificada por escala própria como alta; - : Não foi possível detectar a concentração inibitória mínima por leitura visual.

TABELA 7 - Efeito do extrato de própolis verde obtido por extração convencional etanólica, originário do Estado do Paraná, obtido no ano de 2013 sobre cepas referência e isolados de *Campylobacter* termotolerantes obtidas de alimento de origem avícola.

Cepa/isolado	CIM (mg/mL)	Viabilidade microbiana*	Motilidade microbiana**	Densidade microbiana***
<i>C. coli</i> (IAL)	12,50	-	-	-
<i>C. jejuni</i>	12,50	-	-	-
ATCC 33291				

TABELA 7 - Efeito do extrato de própolis verde obtido por extração convencional etanólica, originário do Estado do Paraná, obtido no ano de 2013 (VeEP13) sobre cepas referência e isolados de *Campylobacter* termotolerantes obtidas de alimento de origem avícola. (continuação)

<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	6,25	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	6,25	-	-	-
CJ – 1	6,25	Sim	NM	++
CJ – 2	12,50	Sim	NM	+
CJ – 3	6,25	Sim	NM	+
CJ – 4	25,00	Sim	M	+
CJ – 5	25,00	Sim	NM	-
CJ – 6	25,00	Sim	NM	-
CJ – 7	12,50	Sim	M	++
CJ – 8	25,00	Sim	M	+
CJ – 9	12,50	Sim	NM	+
CJ – 10	12,50	Sim	M	++
CJ – 11	12,50	Sim	M	++
CJ – 12	25,00	Sim	NM	++
CC – 1	6,25	Sim	M	++
CC – 2	25,00	Sim	NM	+
CC – 3	12,50	Sim	M	++
CC – 4	-	Não	-	-
CC – 5	12,50	Sim	NM	+
CC – 6	25,00	Sim	M	+
CC – 7	12,50	Sim	NM	++
CC – 8	12,50	Sim	M	++
CC – 9	12,50	Sim	M	++
CC – 10	12,50	Sim	M	+
CC – 11	12,50	Sim	M	++
CL	12,50	Sim	NM	-
C	12,50	Sim	NM	+

Legenda :*alteração de cor compatível com CMI; **escore classificado por visualização microscópica: M: Móvel/ NM: Não móvel; *** escore classificado pela escala de densidade: (-) Densidade bacteriana classificada por escala própria como muito baixa (+) Densidade bacteriana classificada por escala própria

como baixa (++) Densidade bacteriana classificada por escala própria como média (+++) Densidade bacteriana classificada por escala própria como alta; - : Não foi possível detectar a concentração inibitória mínima por leitura visual.

TABELA 8- Efeito do extrato de própolis verde obtido por extração assistida por ultrassom, originário do Estado do Paraná, obtido no ano de 2013 (VeUC13) sobre cepas referência e isolados de *Campylobacter* termotolerantes obtidas de alimento de origem avícola.

Cepa/isolado	CIM (mg/mL)	Viabilidade microbiana*	Motilidade microbiana**	Densidade microbiana**
<i>C. coli</i> (IAL)	12,50	-	-	-
<i>C. jejuni</i> ATCC 33291	12,50	-	-	-
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	6,25	-	-	-
<i>S. Enteritidis</i> ATCC 13076	6,25	-	-	-
CJ – 1	6,25	Sim	NM	++
CJ – 2	12,50	Sim	NM	++
CJ – 3	6,25	Sim	NM	++
CJ – 4	25,00	Sim	M	++
CJ – 5	25,00	Sim	NM	+
CJ – 6	25,00	Sim	NM	-
CJ – 7	12,50	Sim	NM	++
CJ – 8	25,00	Sim	NM	+
CJ – 9	12,50	Sim	M	++
CJ – 10	12,50	Sim	NM	++
CJ – 11	12,50	Sim	NM	++
CJ – 12	25,00	Sim	M	++
CC – 1	25,00	Sim	NM	++
CC – 2	25,00	Sim	M	+
CC – 3	12,50	Sim	M	+
CC – 4	-	Não	-	-
CC – 5	25,00	Sim	M	+
CC – 6	25,00	Sim	M	+
CC – 7	12,50	Sim	M	+

TABELA 8- Efeito do extrato de própolis verde obtido por extração assistida por ultrassom, originário do Estado do Paraná, obtido no ano de 2013 (VeUC13) sobre cepas referência e isolados de *Campylobacter* termotolerantes obtidas de alimento de origem avícola. (continuação)

CC – 8	12,50	Sim	NM	++
CC – 9	12,50	Sim	M	+
CC – 10	12,50	Sim	M	++
CC – 11	12,50	Sim	NM	++
CL	12,50	Sim	NM	-
C	12,50	Sim	NM	-

Legenda :*alteração de cor compatível com CIM; **escore classificado por visualização microscópica: M: Móvel/ NM: Não móvel; *** escore classificado pela escala de densidade: (-) Densidade bacteriana classificada por escala própria como muito baixa (+) Densidade bacteriana classificada por escala própria como baixa (++) Densidade bacteriana classificada por escala própria como média (+++) Densidade bacteriana classificada por escala própria como alta; - : Não foi possível detectar a concentração inibitória mínima por leitura visual.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi divergente para as cepas de coleções e para as de campo. Observou-se que os controles empregados referentes ao gênero *Salmonella* denotaram CIM para os quatro extratos (6,25 mg/mL), havendo variação para o extrato vermelho etanólico onde *Salmonella Typhimurium* respondeu a menor concentração (3,12 mg/mL) e *Salmonella Enteritidis* a 6,25 mg/mL.

Para cepas referência de *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* observou-ausência de CIM para o extrato de própolis vermelha obtido por ultrassom e houve divergência somente para o extrato vermelho etanólico quando aplicado a *Campylobacter jejuni* (50,00 mg/mL). Para os demais extratos, esta espécie apresentou CIM a 12,50 mg/mL. *Campylobacter coli* teve a CIM registrada na concentração 12,50 mg/mL.

Vale ressaltar que bactérias Gram-negativas possuem em sua estruturação mecanismos que podem torná-las impermeáveis a diferentes moléculas, isto porque a parede celular é composta por fina camada de peptideoglicanos e está associada a uma camada de lipopolissacarídeos. Tal conformação pode dificultar a penetração de compostos como os fenólicos, diminuindo sua capacidade antimicrobiana¹⁸⁵.

Outro elemento importante a destacar relacionou-se ao método empregado para identificar viabilidade microbiana. Salienta-se que, a avaliação pela alteração de cor, princípio do ensaio, não se mostrou apropriado para isolados de campo de *Campylobacter* termotolerantes. Comparativamente às bactérias de coleções, reforça-se que para *Salmonella* verificou-se alteração de cor, compatível com CIM neste estudo, bem como os

estudos de Benício¹⁸⁶ e Maia¹⁸⁷. *Campylobacter coli* e *Campylobacter jejuni* oriundas de coleções explicitaram CIM, quando houve, compatível com alteração de cor.

Por tais afirmações, esclarece-se que todos os isolados de campo mostraram inconsistência para a reação pela resazurina e CIM. Supõe-se que a variabilidade identificada relacionou-se a três fatores principais como a capacidade de redução da resazurina, a quantidade considerável de oxigênio livre da molécula de resazurina e a toxicidade para o microrganismo que é microaerófilo e altamente suscetível aos processos relacionados a injúria celular quando exposto a quantidades maiores que 5% de O₂ no ambiente. Em outra instância, este efeito não foi observado nas culturas de coleções, pela sua padronização e manutenção das características originais. Como isolados de campo são altamente adaptáveis a diferentes ambientes e privação de componentes essenciais, a resposta aos extratos em diferentes concentrações e concomitantemente à presença da resazurina, não permitiu o melhor desempenho do ensaio, ou o esperado quanto às maiores concentrações serem inibitórias, como descrito em estudos para microrganismos menos exigentes.

Ressalta-se que de todos os padrões analisados, a motilidade foi o atributo mais relevante devido à evidência desta habilidade nos isolados testados. Bactérias móveis têm potencial capacidade de reconhecimento de áreas específicas para penetração em tecidos, invasão, disseminação. Esta habilidade otimiza a virulência quando comparada aos outros padrões analisados, pontuados neste estudo.

A Figura 4 ilustra a resposta de CJ-5 aos quatro extratos e a coloração azul/arroxeadas em concentrações igual ou inferior a 6,25 mg/mL. Esta informação deve ser contrastada com aquelas apresentadas nas Tabelas 5, 6, 7 e 8.

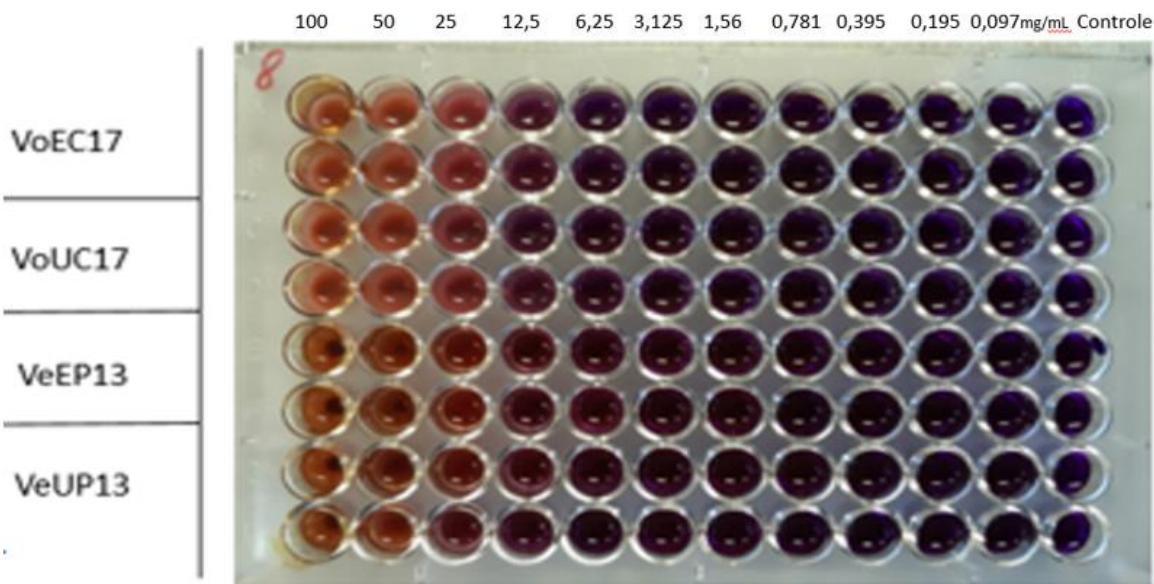


FIGURA 4 – Resposta de *Campylobacter jejuni* (CJ – 5) após 48 horas de incubação e adição da solução de resazurina. As colunas de 1 a 11 correspondem às diluições de cada extrato 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,781; 0,390 e 0,195 e 0,097 mg/mL, respectivamente. A coluna 12 representa o controle da solução de resazurina a 0,01% (presença do microrganismo sem adição do extrato da própolis). Cor de azul a lilás indica ausência de células viáveis e cor rosa indica a presença de células viáveis.

De maneira geral, a mudança de coloração desse reagente ocorreu nas maiores concentrações dos extratos de própolis, tanto vermelho quanto verde, independentemente do método de extração empregado. Nas maiores concentrações de própolis houve maior viabilidade microbiana, o que permite considerar que as concentrações da ordem de 12,5 mg/mL a 100 mg/mL protegem o patógeno; o que pode ser comprovado pela intensa motilidade identificada em microscopia de contraste de fase. Em contrapartida, nas menores concentrações que essas há menor número de células viáveis (Figura 4) e a motilidade não foi observada. Assim, pode-se supor que concentrações maiores que 6,25 mg/mL de extratos de própolis verde e vermelha, mesmo em condições hostis de maior presença de oxigênio livre, decorrentes das reações de oxirredução da resazurina, protegem o microrganismo. Em concentrações menores, a capacidade antioxidante é menos expressiva, o que desencadeia o fenômeno de células viáveis e não cultiváveis, com morfologia alterada e menor capacidade para a motilidade. Por sua vez, o poço controle em que há adição do microrganismo e da resazurina ilustra a inatividade da bactéria, o que pode ser explicado pela lenta redução cuja velocidade da reação é dependente do patógeno.

Por associação às descrições anteriores, trabalhos divergem quanto a eficácia de extratos de própolis de acordo com gêneros bacterianos. Alguns autores encontraram

extratos de própolis capazes de inibir apenas bactérias Gram-positivas^{16,188} outros trabalhos demonstraram atividade fraca contra bactérias Gram-negativas¹⁸⁹. Uzel et al., 2005¹⁹⁰ demonstraram que bactérias Gram-positivas são, normalmente, suscetíveis a baixa concentração de própolis e o crescimento de bactérias Gram-negativas é inibido apenas em concentrações mais altas. Isto se justifica pela estrutura de parede celular dessas bactérias, a membrana externa presente na parede celular das bactérias Gram-negativas age como uma barreira de permeabilidade, dificultando a ação dos compostos antimicrobianos de uma forma geral¹⁹¹.

Relativo ao extrato de própolis vermelha obtido por extração convencional etanólica, foi possível observar que os isolados de *Campylobacter jejuni* apresentaram como CIM predominante a concentração de 25,00 mg/mL, já para os isolados da espécie *Campylobacter coli* submetidos a exposição desse mesmo extrato percebeu-se que a CIM da maioria dos isolados foi de 12,5 mg/mL. No entanto, estes dados devem ser contrapostos às variáveis anteriormente mencionadas como motilidade e densidade, uma vez que se observa inconsistência quanto à ativa motilidade e média a alta densidade bacteriana, o que contradiz o princípio da menor concentração passível de inibição.

A concentração inibitória mínima encontrada para a maioria dos isolados submetidos a exposição das própolis verdes foi em torno de 12,50 a 25,00 mg/mL. Não se observou diferença das concentrações inibitórias mínimas entre as espécies e nem entre os métodos de extração testados. Além disso, vale ressaltar que comparativamente a exposição aos extratos de própolis vermelha os resultados apresentaram menor motilidade e densidade bacteriana. O que ressalta a diferença de potencial de ativação microbiana entre os tipos de extrato e suas formas de obtenção, diretamente relacionado com os compostos presentes em cada tipo.

Estudo desenvolvido por Machado et al.³⁰ demonstrou que entre a própolis verde, marrom e vermelha, a última apresenta o maior potencial biológico assim como a maior quantidade de compostos antioxidantes e antimicrobiano com maior efetividade para microrganismos Gram-positivos. Rufatto et al.¹⁹² desenvolveram estudo utilizando o fracionamento bioguiado em extrato hidroalcoólico de própolis vermelha originária do estado de Alagoas, e obteve subfrações com notável atividade bacteriostática, demonstrando o potencial antimicrobiano dessa própolis. Entretanto o trabalho desenvolvido nessa dissertação não corrobora com os resultados de Machado et al.³⁰ e Rufatto et al.¹⁹², considerando divergência entre os microrganismos avaliados nos três

estudos, as particularidades de exigência das espécies *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli* e *Campylobacter lari* e a resposta diversificada dos extratos para os isolados que subsidiaram o estudo.

Foi observado nesta pesquisa que não houve diferença entre a motilidade e densidade observada dos isolados quando submetidos à extrato de própolis de mesma coloração obtida por método de extração diferente. Possibilitando a inferência de que não há influência do método de extração dos extratos no comportamento bacteriano observado. Dessa forma, sendo o método de extração assistida por ultrassom o que apresenta maior eficiência em custo/benefício para este estudo.

É necessário descrever que mesmo a partir de métodos de extração diferentes, os extratos de própolis apresentaram efeito antimicrobiano, baseado no princípio do ensaio que consiste na alteração de cor, em diferentes concentrações para isolados de campo.

Foi observado em quatro dos isolados de campo analisados (*Campylobacter coli* 5 e 8; *Campylobacter lari* e *Campylobacter* termotolerante) comportamento de resposta diferente dos demais isolados. Houve oxidação da resazurina nas maiores e menores concentrações dos extratos de própolis. Ressalta-se a ocorrência de oxidação desse reagente nos poços da coluna 12 (Figura 5). Observou-se nesses casos a presença de estruturas bacilares por meio da microscopia óptica como pode ser visualizado na Figura 6 (A, B, C e D).

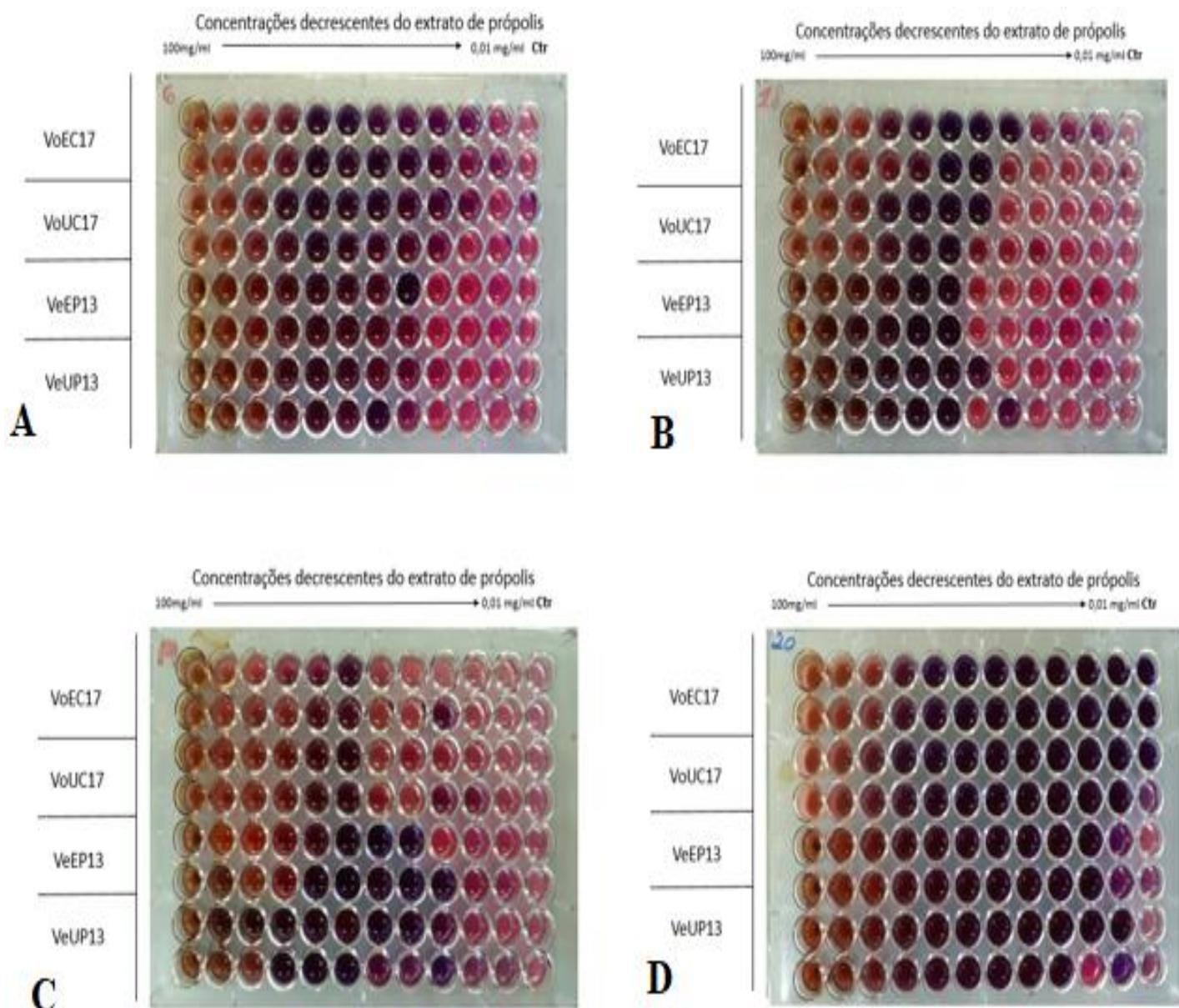


FIGURA 5 - Microplacas com isolados (A) *Campylobacter lari* – CL; (B) *Campylobacter* spp. – C; (C) *Campylobacter coli* – CC5; (D) *Campylobacter coli* – CC8 após 48 horas de incubação e adição da solução de resazurina. As colunas de 1 a 11 correspondem às seguintes diluições de cada extrato: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,781; 0,390 e 0,195 e 0,097 mg/mL, respectivamente. A coluna 12 representa o controle da solução de resazurina a 0,01% (presença do microrganismo sem adição do extrato da própolis). Cor

de azul a lilás indica ausência de células viáveis e cor rosa indica a presença de células viáveis.

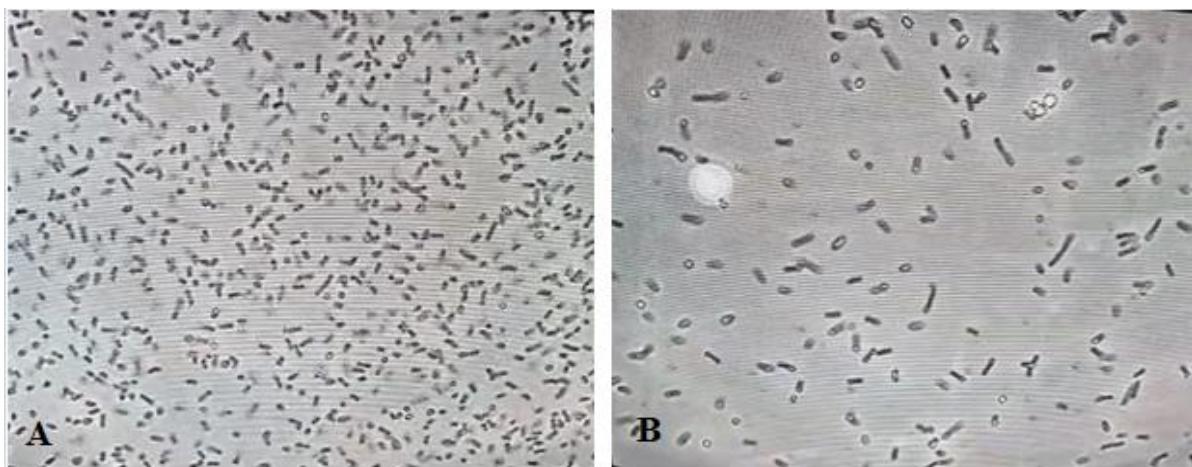


FIGURA 6 – Imagens obtidas por microscopia óptica nas quais observa-se a presença de bacilos. (A) – Densidade bacteriana classificada por escala própria como alta (++) e presença de bacilos; (B) - Densidade bacteriana classificada por escala própria como média (+) e presença de bacilos.

Quanto à oxidação da resazurina na presença de células viáveis junto a todos os isolados testados, acredita-se que isso se deve aos fatores relacionados à proteção das células bacterianas quando avaliadas as quatro maiores concentrações das diferentes própolis. Esta resposta culminou com outros achados como maior motilidade bacteriana revelando que os microrganismos estiveram menos expostos à possibilidade de tornarem-se viáveis não cultiváveis, considerando o ambiente hostil de exposição. Mesmo assim, a variação de respostas em uma mesma espécie pode decorrer do fato da capacidade de adaptação da estirpe e a diversidade existente em mesmas espécies e entre espécies, o que para este gênero bacteriano é viável. Trabalhos de Meinersman et al.¹⁹³, Endtz et al.¹⁹⁴, e Wilson et al.¹⁹⁵ descreveram a existência de diversidade genética dentro de cada espécie e subespécie de *Campylobacter* termotolerante. Assim como as respostas desses isolados pode estar associada à diferença de genes de virulência e resistência. Entretanto, esses genes não foram avaliados neste estudo.

Acrescenta-se que contradições também estão associadas aos extratos naturais pela variabilidade dos compostos, apontados por Rios et al.¹⁹⁶, conforme a época do ano para obtenção, fatores geográficos e floradas.

O comportamento bacteriano observado também pode estar diretamente relacionado aos componentes presentes nos extratos de própolis. De acordo com Bankova et al.¹³, a própolis oriunda de regiões tropicais possui diversidade maior de compostos

devido à variação de sua origem botânica, o que pode ter contribuído para interromper efeitos relacionados ao estresse oxidativo das espécies testadas. Neste caso, supõe-se que os dois tipos de própolis tenham compostos que para o metabolismo da bactéria sejam efetivos quanto ao efeito de recuperação celular, quanto aos estágios de injúria celular facilmente induzidos para este patógeno. Ressalta-se que *Campylobacter* spp. é um gênero bacteriano altamente suscetível à ação atmosférica e variações do meio em que está havendo autoindução da situação de formas viáveis não cultiváveis, não aptas ao diagnóstico laboratorial, mas passíveis de induzir doença se ingeridas.

Não se encontrou na literatura trabalhos desenvolvidos com as espécies analisadas neste estudo, cuja origem trata-se de carcaças de frangos e própolis que tenham relatado resultado semelhante. Também não se encontrou o uso de própolis como estimulador ao desenvolvimento de *Campylobacter*. Sugere-se que ensaios de viabilidade celular por meio da resazurina podem não ser a melhor aplicação quando se trata de *Campylobacter* termotolerantes devido à ecologia da bactéria.

O uso desse reagente para comprovação de viabilidade celular em isolados de origem alimentar vem sendo amplamente comprovado^{197, 198}. Trabalhos desenvolvido por Benicio¹⁸⁶ e Maia¹⁸⁷ observaram plena capacidade de resposta destes extratos, nestas concentrações, quando teve como foco de investigação *Salmonella enterica*. Entretanto, mesmo se tratando de isolados de origem alimentar, mesmos própolis e bactéria Gram-negativas, há diferenças importantes de ecologia microbiana que devem ser consideradas entre duas espécies diferentes e até mesmo entre isolados de mesma espécie, que como visto neste trabalho não se comportaram de maneira semelhante.

Em outra instância, para fungos os resultados conflitantes também foram registrados conforme Roca et al, 2019¹⁹⁹. Estes autores discorreram que a ausência de respostas coerentes para microrganismos analisados pode decorrer da própria resazurina, não sendo um indicador de crescimento celular eficaz. Corroborando com a ideia desta discussão de que para certos gêneros esse indicador não seria o parâmetro ideal para viabilidade celular.

Baseado nos resultados encontrados nesse estudo pode-se afirmar que as respostas variáveis para atividade microbiana de extratos de própolis sobre as espécies de *Campylobacter jejuni*, *Campylobacter coli*, *Campylobacter lari* e para o isolado de classificação somente para gênero decorrem da interação entre composição química dos extratos e do metabolismo e adaptação diversificados do gênero. O efeito protetivo das

espécies em altas concentrações dos quatro extratos é passível de pesquisa e pode ser um recurso analítico importante, tendo em vista que o gênero relaciona-se a procedimentos analíticos exigentes no âmbito laboratorial.

8. CONCLUSÃO

A própolis verde analisada possui menor concentração de flavonoides e menor capacidade antioxidante que a própolis vermelha.

Extratos de própolis verde e vermelha, das regiões Nordeste e Sul do Brasil, apresentaram efeito antimicrobiano variável e insatisfatório para isolados de *Campylobacter* termotolerantes, independente do método de extração.

Os extratos de própolis, em altas concentrações, apresentaram efeito protetor celular, independente do método de extração, o que permite sugerir mais estudos neste sentido.

9. REFERÊNCIAS

1. EFSA, ECDC. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2016. EFSA Journal: 2017 2017-12-12. Report No.: Contract No.: 5077.
2. CDC. Foodborne Diseases Active Surveillance Network (FoodNet): FoodNet 2015 Surveillance Report (Final Data). Atlanta, Georgia: U.S. Department of Health and Human Services, 2017.
3. WHO. *Campylobacter* - Key facts: World Health Organization; 2018 [23-10-2018].
4. Kaakoush NO, Castaño-Rodríguez N, Mitchell HM, Man SM. Global Epidemiology of *Campylobacter* Infection. Clin Microbiol Rev. 2015;28(3):687-720.
5. WHO. WHO Consultation on the Increasing Incidence of Human Campylobacteriosis. The increasing incidence of human campylobacteriosis report and proceedings of a WHO consultation of experts, Copenhagen, Denmark, 21-25 November 2000. Geneva : World Health Organization; 2001.
6. Hofreuter D. Defining the metabolic requirements for the growth and colonization capacity of *Campylobacter jejuni*. Front Cell Infect Microbiol. 2014;4:137.
7. Sibanda N, McKenna A, Richmond A, Ricke SC, Callaway T, Stratakos AC, et al. A Review of the Effect of Management Practices on *Campylobacter* Prevalence in Poultry Farms. Front Microbiol. 2018;9:2002.
8. Robyn J, Rasschaert G, Hermans D, Pasman F, Heyndrickx M. In vivo broiler experiments to assess anti-*Campylobacter jejuni* activity of a live *Enterococcus faecalis* strain. Poult Sci. 2013;92(1):265-71.
9. Dhillon AS, Shivaprasad HL, Schaberg D, Wier F, Weber S, Bandli D. *Campylobacter jejuni* infection in broiler chickens. Avian Dis. 2006;50(1):55-8.
10. Alfredson DA, Korolik V. Antibiotic resistance and resistance mechanisms in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli*. FEMS Microbiol Lett. 2007;277(2):123-32.
11. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States 2019.
12. Nabavi SF, Di Lorenzo A, Izadi M, Sobarzo-Sánchez E, Daglia M, Nabavi SM. Antibacterial Effects of Cinnamon: From Farm to Food, Cosmetic and Pharmaceutical Industries. Nutrients. 2015;7(9):7729-48.
13. Bankova VS, Castro SLd, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. 2000;31(1):3-15.
14. Brasil. Ministério da Agricultura PeAINn, de 19 de janeiro de 2001. Anexo VII - Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de extrato própolis.
15. Sforcin JM, Fernandes A, Jr., Lopes CA, Bankova V, Funari SR. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. J Ethnopharmacol. 2000;73(1-2):243-9.
16. Marcucci M. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie. 1995;26(2):83-99.
17. Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. J Ethnopharmacol. 2005;100(1-2):114-7.

18. Pereira AdS, Silva FRM, Neto FRdA. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Química Nova*. 2002;25(2):321-6.
19. Ghisalberti EL. Propolis: A Review. *Bee World*. 1979;60(2).
20. Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Neto PJR. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 2008;18(3).
21. Pobiega K, Kraśniewska K, Gniewosz M. Application of propolis in antimicrobial and antioxidative protection of food quality – A review. *Trends in Food Science & Technology*. 2019;83:53-62.
22. Reis JHO, Barreto GA, Cerqueira JC, Anjos JPD, Andrade LN, Padilha FF, et al. Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PLoS One*. 2019;14(7):e0219063.
23. Devequi-Nunes D, Machado BAS, Barreto GdA, Silva JR, Silva DFd, Rocha JLcd, et al. Chemical characterization and biological activity of six different extracts of propolis through conventional methods and supercritical extraction. *Plos One*. 2019.
24. Machado BA, Silva RP, Barreto GeA, Costa SS, Silva DF, Brandão HN, et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *PLoS One*. 2016;11(1):e0145954.
25. Cottica SM, Sabik H, Antoine C, Fortin J, Graveline N, Visentainer JV, et al. Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. *LWT - Food Science and Technology*. 2015;60(1):609-14.
26. Cao J, Peng LQ, Du LJ, Zhang QD, Xu JJ. Ultrasound-assisted ionic liquid-based micellar extraction combined with microcrystalline cellulose as sorbent in dispersive microextraction for the determination of phenolic compounds in propolis. *Anal Chim Acta*. 2017;963:24-32.
27. Paviani LC, Saito E, Dariva C, Marcucci MC, Sánchez-Camargo AP, Cabral FA. Supercritical CO₂ extraction of raw propolis and its dry ethanolic extract. *Brazilian Journal of Chemical Engineering*. 2012;29.
28. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? *J Ethnopharmacol*. 2011;133(2):253-60.
29. Silva RPD, Machado BAS, Barreto GdA, Costa SS, Andrade LN, Amaral RG, et al. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLOS ONE*. 2017;12(3).
30. Machado BA, Silva RP, Barreto Gde A, Costa SS, Silva DF, Brandao HN, et al. Chemical Composition and Biological Activity of Extracts Obtained by Supercritical Extraction and Ethanolic Extraction of Brown, Green and Red Propolis Derived from Different Geographic Regions in Brazil. *PLoS One*. 2016;11(1):e0145954.
31. SVS FOC, Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylobacter*. In: Saúde Md, editor. Brasília: Ministério da Saúde; 2011. p. 40.

32. Manual of Diagnostic Tests and Vaccines for Terrestrial Animals: OIE - World Organization for Animal Health. 2017. Available from: <http://www.oie.int/manual-of-diagnostic-tests-and-vaccines-for-terrestrial-animals/>.
33. Umaraw P, Prajapati A, Verma AK, Pathak V, Singh VP. Control of *Campylobacter* in poultry industry from farm to poultry processing unit: A review. Crit Rev Food Sci Nutr. 2017;57(4):659-65.
34. Park SF. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. Int J Food Microbiol. 2002;74(3):177-88.
35. Moore JE, Corcoran D, Dooley JS, Fanning S, Lucey B, Matsuda M, et al. *Campylobacter*. Vet Res. 2005;36(3):351-82.
36. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, et al. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. Nature. 2000;403(6770):665-8.
37. Humphrey T, O'Brien S, Madsen M. *Campylobacters* as zoonotic pathogens: a food production perspective. Int J Food Microbiol. 2007;117(3):237-57.
38. Silva Nd, Junqueira VCA, Silveira NFdA, Taniwaki MH, Gomes RAR, Okazaki MM. Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos e Água. 5 ed: Blucher; 2017.
39. Tam CC, Higgins CD, Neal KR, Rodrigues LC, Millership SE, O'Brien SJ. Chicken Consumption and Use of Acid-Suppressing Medications as Risk Factors for *Campylobacter* Enteritis, England. Emerg Infect Dis. 152009. p. 1402-8.
40. Doorduyn Y, Van Den Brandhof WE, Van Duynhoven YT, Breukink BJ, Wagenaar JA, Van Pelt W. Risk factors for indigenous *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* infections in The Netherlands: a case-control study. Epidemiol Infect. 2010;138(10):1391-404.
41. Ireland FSAo. Survey to Determine the Prevalence of *Campylobacter* and *Salmonella* on Raw Chicken on Retail Sale in Ireland in 2011 (11NS2). Dublin2016.
42. Murphy C, Carroll C, Jordan KN. Environmental survival mechanisms of the foodborne pathogen *Campylobacter jejuni*. J Appl Microbiol. 2006;100(4):623-32.
43. Magajna BA, Schraft H. *Campylobacter jejuni* biofilm cells become viable but non-culturable (VBNC) in low nutrient conditions at 4 °C more quickly than their planktonic counterparts. Food Control. 2015;50:45-50.
44. Pitkanen T. Review of *Campylobacter* spp. in drinking and environmental waters. J Microbiol Methods. 2013;95(1):39-47.
45. Kim J-C, Oh E, Kim J, Jeon B. Regulation of oxidative stress resistance in *Campylobacter jejuni*, a microaerophilic foodborne pathogen. Frontiers in Microbiology. 2015;6.
46. Mihaljevic RR, Sikic M, Klancnik A, Brumini G, Mozina SS. Environmental stress factors affecting survival and virulence of *Campylobacter jejuni*. Microbial Pathogenesis. 2007;43(2-3):120-5.
47. Bolton DJ. *Campylobacter* virulence and survival factors. Food Microbiol. 2015;48:99-108.

48. Chaveerach P, ter Huurne A, Lipman LJA, van Knapen F. Survival and Resuscitation of Ten Strains of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* under Acid Conditions. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(1):711-4.
49. Baffone W, Casaroli A, Citterio B, Pierfelici L, Campana R, Vittoria E, et al. *Campylobacter jejuni* loss of culturability in aqueous microcosms and ability to resuscitate in a mouse model. *Int J Food Microbiol*. 2006;107(1):83-91.
50. Chaisowwong W, Kusumoto A, Hashimoto M, Harada T, Maklon K, Kawamoto K. Physiological characterization of *Campylobacter jejuni* under cold stresses conditions: its potential for public threat. *J Vet Med Sci*. 2012;74(1):43-50.
51. Jay JM. *Microbiologia de Alimentos*. 6 ed. Porto Alegre: ArchMed; 2005.
52. Ica T, Caner V, Istanbullu O, Nguyen HD, Ahmed B, Call DR, et al. Characterization of mono- and mixed-culture *Campylobacter jejuni* biofilms. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(4):1033-8.
53. Bronowski C, James CE, Winstanley C. Role of environmental survival in transmission of *Campylobacter jejuni*. *FEMS Microbiol Lett*. 2014;356(1):8-19.
54. Duffy LL, Dykes GA. The Ability of *Campylobacter jejuni* Cells to Attach to Stainless Steel Does Not Change as They Become Nonculturable. <https://homeliebertpubcom/fpd>. 2009.
55. Kidon Sung SK. Biofilm Development by *Campylobacter Jejuni* - Biofilms in the Food Environment - Wiley Online Library. 2015. In: *Biofilms in the Food Environment* [Internet]. John Wiley & Sons. 2. Available from: <https://onlinelibrarywiley-com.ez49.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1002/9781118864036.ch2>.
56. Ahmad AAKJBSMSKASAI. Applications of Biofilm and Quorum Sensing Inhibitors in Food Protection and Safety - Biofilms in Plant and Soil Health - Wiley Online Library. 2017. In: *Biofilms in Plant and Soil Health* [Internet]. John Wiley & Sons Ltd. Available from: <https://onlinelibrarywiley-com.ez49.periodicos.capes.gov.br/doi/abs/10.1002/9781119246329.ch22>.
57. EC. A European One Health Action Plan against Antimicrobial Resistance (AMR). 2017.
58. CDC. *Campylobacter* (Campylobacteriosis) | *Campylobacter* | CDC: CDC; 2019 [updated 2019-08-12T01:14:22Z/25/09/2019]. Available from: <https://www.cdc.gov/campylobacter/>.
59. Jacobsen G, Flôres ML. Condenações por síndrome ascítica em frangos abatidos sob inspeção federal entre 2002 e 2006 no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. *Ciência Rural*. 2008;38(7):1966-71.
60. WHO | Strengthening surveillance of and response to foodborne diseases. 2017 2017-11-17 14:58:23. In: WHO [Internet]. World Health Organization. Available from: http://www.who.int/foodsafety/publications/foodborne_disease/surveillancemanual/en/.
61. PHE. A Microbiological survey of campylobacter contamination in fresh whole UK produced chilled chickens at retail sale (2017-2018). Public Health England, 2019.
62. Noormohamed A, Fakhr MK. Prevalence and Antimicrobial Susceptibility of *Campylobacter* spp. in Oklahoma Conventional and Organic Retail Poultry. *Open Microbiol J*. 2014;8:130-7.

63. Cox NA, Cosby DE, Thippareddi H, Ritz CW, Berrang ME, Jackson JS, et al. Incidence, species and antimicrobial resistance of naturally occurring *Campylobacter* isolates from quail carcasses sampled in a commercial processing facility. Journal of Food Safety. 2018;38.
64. Salihu MD, Junaidu AU, Magaji AA, Abubakar MB, Adamu AY, Yakubu AS. Prevalence of *Campylobacter* in poultry meat in Sokoto, North-western Nigeria. 2009.
65. Olatoye O, Ogunsemoyin O. Prevalence and Antibiotics Resistance of *Campylobacter jejuni* in Retail Chickens in Oyo State, Nigeria. 48. 2016.
66. Carron M, Chang YM, Momanyi K, Akoko J, Kiiru J, Bettridge J, et al. *Campylobacter*, a zoonotic pathogen of global importance: Prevalence and risk factors in the fast-evolving chicken meat system of Nairobi, Kenya. PLoS Negl Trop Dis. 2018;12(8):e0006658.
67. Karikari AB, Obiri-Danso K, Frimpong EH, Kroffelt KA. Antibiotic Resistance of *Campylobacter* Recovered from Faeces and Carcasses of Healthy Livestock. Biomed Res Int. 2017;2017:4091856.
68. Bouhamed R, Bouayad L, Messad S, Zenia S, Naim M, Hamdi TM. Sources of contamination, prevalence, and antimicrobial resistance of thermophilic *Campylobacter* isolated from turkeys. Vet World. 2018;11(8):1074-81.
69. Franchin PR, Ogliari PJ, Batista CR. Frequency of thermophilic *Campylobacter* in broiler chickens during industrial processing in a Southern Brazil slaughterhouse. Br Poult Sci. 2007;48(2):127-32.
70. Feistel JC. Caracterização de *Campylobacter* spp. isoladas em carcaças de frango [Dissertação]: Universidade Federal de Goiás; 2013.
71. Moura HM, Silva PR, da Silva PH, Souza NR, Racanicci AM, Santana AP. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from chicken carcasses in the Federal District, Brazil. J Food Prot. 2013;76(4):691-3.
72. Sierra-Arguello YM, Perdoncini G, Morgan RB, Salle CTP, Moraes HLS, Gomes MJP, et al. Fluoroquinolone and macrolide resistance in *Campylobacter jejuni* isolated from broiler slaughterhouses in southern Brazil. Avian Pathology. 2016;45(1).
73. USDA. Livestosk and Poultry: World Markets and Trade. Agriculture Foreign Agricultural Service, 2018.
74. Authority EFS. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA Journal. 2018;16.
75. Gillespie IA, O'Brien SJ, Frost JA, Adak GK, Horby P, Swan AV, et al. A case-case comparison of *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* infection: a tool for generating hypotheses. Emerg Infect Dis. 2002;8(9):937-42.
76. Hansson I, Sandberg M, Habib I, Lowman R, Engvall EO. Knowledge gaps in control of *Campylobacter* for prevention of campylobacteriosis. Transbound Emerg Dis. 2018;65 Suppl 1:30-48.
77. Sheppard SK, Dallas JF, Strachan NJ, MacRae M, McCarthy ND, Wilson DJ, et al. *Campylobacter* genotyping to determine the source of human infection. Clin Infect Dis. 2009;48(8):1072-8.

78. (BIOHAZ) EPoBH. Scientific Opinion on *Campylobacter* in broiler meat production: control options and performance objectives and/or targets at different stages of the food chain. EFSA Journal 9(4):2105 [141 pp].
79. Dasti JI, Tareen AM, Lugert R, Zautner AE, Gross U. *Campylobacter jejuni*: a brief overview on pathogenicity-associated factors and disease-mediating mechanisms. Int J Med Microbiol. 2010;300(4):205-11.
80. Williams LK, Sait LC, Trantham EK, Cogan TA, Humphrey TJ. *Campylobacter* infection has different outcomes in fast- and slow-growing broiler chickens. Avian Dis. 2013;57(2):238-41.
81. Scallan E, Hoekstra RM, Mahon BE, Jones TF, Griffin PM. An assessment of the human health impact of seven leading foodborne pathogens in the United States using disability adjusted life years. Epidemiol Infect. 2015;143(13):2795-804.
82. Lévesque S, Fournier E, Carrier N, Frost E, Arbeit RD, Michaud S. Campylobacteriosis in Urban versus Rural Areas: A Case-Case Study Integrated with Molecular Typing to Validate Risk Factors and to Attribute Sources of Infection. Plos One. 2013.
83. Strachan NJC, Rotariu O, MacRae M, Sheppard SK, Smith-Palmer A, Cowden J, et al. Operationalising Factors That Explain the Emergence of Infectious Diseases: A Case Study of the Human Campylobacteriosis Epidemic. Plos One. 2013.
84. Skarp CPA, Hanninen ML, Rautelin HIK. Campylobacteriosis: the role of poultry meat. Clin Microbiol Infect. 2016;22(2):103-9.
85. Ahs JW, Tao W, Löfgren J, Forsberg BC. Diarrheal Diseases in Low- and Middle-Income Countries: Incidence, Prevention and Management. The Open Infectious Diseases Journal. 2010;4.
86. EFSA. *Campylobacter*: EFSA EU; 2019 [cited 2019 25/09/2019]. Available from: <https://www.efsa.europa.eu/en/topics/topic/campylobacter>.
87. DM T, EP M, PM G, al e. Preliminary Incidence and Trends of Infections with Pathogens Transmitted Commonly Through Food — Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2015–2018 | MMWR. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2018(68):369–73.
88. Kotloff KL, Blackwelder WC, Nasrin D, Nataro JP, Farag TH, van Eijk A, et al. The Global Enteric Multicenter Study (GEMS) of diarrheal disease in infants and young children in developing countries: epidemiologic and clinical methods of the case/control study. Clin Infect Dis. 2012;55 Suppl 4:S232-45.
89. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human campylobacteriosis in developing countries. Emerg Infect Dis. 2002;8(3):237-44.
90. WHO. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. WHO. 2015.
91. MFDS. Ministry of Food and Drug Safety: MFDS; 2019 [cited 2019 25/09/2019]. Available from: <https://www.mfds.go.kr/eng/index.do#none>.
92. Furuta M, Nasu T, Umeki K, Hoang Minh D, Honjoh KI, Miyamoto T. Characterization and Application of Lytic Bacteriophages against *Campylobacter jejuni* Isolated from Poultry in Japan. Biocontrol Sci. 2017;22(4):213-21.
93. FSCJ. Food Safety Comission of Japan 2018 [03-11-2018]. Available from: <https://www.fsc.go.jp/fsciis/evaluationDocument/show/kya20041216001>.

94. Asuming-Bediako N, Kunadu AP-H, Abraham S, Habib I. *Campylobacter* at the Human–Food Interface: The African Perspective. *Pathogens*. 2019;8(2):87.
95. Luangtongkum T, Jeon B, Han J, Plummer P, Logue CM, Zhang Q. Antibiotic resistance in *Campylobacter*: emergence, transmission and persistence. *Future Microbiol*. 2009;4(2):189-200.
96. Reddy S, Zishiri OT. Detection and prevalence of antimicrobial resistance genes in *Campylobacter* spp. isolated from chickens and humans. *Onderstepoort j vet res*. 2017;84(1):1-6.
97. Szczepanska B, Andrzejewska M, Spica D, Klawe JJ. Prevalence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated from children and environmental sources in urban and suburban areas. *BMC Microbiol*. 2017;17(1):80.
98. Nguyen TNM, Hotzel H, Njeru J, Mwituria J, El-Adawy H, Tomaso H, et al. Antimicrobial resistance of *Campylobacter* isolates from small scale and backyard chicken in Kenya. *Gut Pathogens*. 2016;8(1):39.
99. Jonker A, Picard JA. Antimicrobial susceptibility in thermophilic *Campylobacter* species isolated from pigs and chickens in South Africa. *J S Afr Vet Assoc*. 2010;81(4):228-36.
100. ONUBRASIL. Apesar de baixa fertilidade, mundo terá 9,8 bilhões de pessoas em 2050: ONUBRASIL; 2017 [updated 2017-06-22]. Available from: <https://nacoesunidas.org/apesar-de-baixa-fertilidade-mundo-tera-98-bilhoes-de-pessoas-em-2050/>.
101. FAO. FAO Initiatives on Prevention and Control of Antimicrobial Resistance (AMR). Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2017.
102. Burnham CD, Leeds J, Nordmann P, O'Grady J, Patel J. Diagnosing antimicrobial resistance. *Nat Rev Microbiol*. 2017;15(11):697-703.
103. FAO. FAO Action Plan on Antimicrobial Resistance 2016-2020 | Global Forum on Food Security and Nutrition (FSN Forum). Rome: Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2016.
104. WHO. The evolving threat of antimicrobial resistance - Options for action. Switzerland: World Health Organization; 2012. Available from: <https://www.afro.who.int/publications/evolving-threat-antimicrobial-resistance-options-action>.
105. OIE. OIE Strategy tackles the threat of Antimicrobial Resistance (AMR) in Animals: OIE - World Organisation for Animal Health. World Organisation for Animal Health; 2016.
106. Grace D. Review of evidence on antimicrobial resistance and animal agriculture in developing countries. 2015.
107. Jindal A, Pandya K, Khan I. Antimicrobial resistance: A public health challenge. *Med J Armed Forces India*. 2015;71(2):178-81.
108. OIE. AMR: OIE - World Organisation for Animal Health 2018. Available from: <http://www.oie.int/en/for-the-media/amr/>.
109. FDA. CVM Updates - FDA Releases Annual Summary Report on Antimicrobials Sold or Distributed in 2016 for Use in Food-Producing Animals. WebContent. Center for Veterinary Medicine, 2016.

110. Organization WH. The evolving threat of antimicrobial resistance: options for action: executive summary. World Health Organization; 2012.
111. WHO. Global action plan on antimicrobial resistance. WHO: World Health Organization; 2017.
112. EFSA. The European Union summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2017. EFSA Journal. 2019;17(2).
113. CDC. Antibiotic resistance threats in the United States, 2013-2019.
114. FAO, OIE, WHO. Joint FAO/OIE/WHO Expert Workshop on Non-Human Antimicrobial Usage and Antimicrobial Resistance: Scientific assessment. Geneva: 2003.
115. O'Hara GA, Fitchett JRA, Klein JL. *Campylobacter* bacteremia in London: A 44-year single-center study. Diagn Microbiol Infect Dis. 2017;89(1):67-71.
116. Spapen J, Hermans H, Rosseel M, Buysschaert I. *Campylobacter jejuni*-related cardiomyopathy: Unknown entity or yet underreported? Int J Cardiol. 2015;198:24-5.
117. Bona EAMD, Pinto FGdS, Fruet TK, Jorge TCM, Moura ACD. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. Arquivos do Instituto Biológico. 2014;81(3):218-25.
118. Rodriguez-Garcia A, Peixoto IT, Verde-Star MJ, De la Torre-Zavala S, Aviles-Arnaut H, Ruiz AL. In Vitro Antimicrobial and Antiproliferative Activity of Amphiptygium adstringens. Evid Based Complement Alternat Med. 2015;2015:175497.
119. Ashraf S, Anjum AA, Ahmad A, Firyal S, Sana S, Latif AA. In vitro activity of Nigella sativa against antibiotic resistant *Salmonella enterica*. Environ Toxicol Pharmacol. 2018;58:54-8.
120. Assis FV, Siqueira FL, Goncalves IE, Lacerda RP, Nascimento RA, Araujo SG, et al. Antibacterial activity of *Lamiaceae* plant extracts in clinical isolates of multidrug-resistant bacteria. An Acad Bras Cienc. 2018;90(2):1665-70.
121. Borges JDC, Perim MC, de Castro RO, Araujo TAS, Peixoto Sobrinho T, da Silva ACO, et al. Evaluation of antibacterial activity of the bark and leaf extracts of *Brosimum gaudichaudii* Trecul against multidrug resistant strains. Nat Prod Res. 2017;31(24):2931-5.
122. Yeabyo S, Teka MZ, Gopalakrishnan VK, Hagos Z, KK C. Antibacterial activity of root extracts of *Verbascum sinaiticum* against multidrug-resistant *Enterobacteriaceae* family Gram-negative and two Gram-positive bacteria. Drug Invention Today 2018;10(8).
123. Bezek K, Kurincic M, Knauder E, Klancnik A, Raspor P, Bucar F, et al. Attenuation of Adhesion, Biofilm Formation and Quorum Sensing of *Campylobacter jejuni* by *Euodia ruticarpa*. Phytother Res. 2016;30(9):1527-32.
124. Dzotam JK, Touani FK, Kuete V. Antibacterial activities of the methanol extracts of *Canarium schweinfurthii* and four other Cameroonian dietary plants against multi-drug resistant Gram-negative bacteria. Saudi J Biol Sci. 2016;23(5):565-70.
125. Mostafa AA, Al-Askar AA, Almaary KS, Dawoud TM, Sholkamy EN, Bakri MM. Antimicrobial activity of some plant extracts against bacterial strains causing food poisoning diseases. Saudi J Biol Sci. 2018;25(2):361-6.

126. Nothias L-F, Knight R, Dorresteijn PC. Antibiotic discovery is a walk in the park. 2016.
127. Park Y, Alencar S, Aguiar C. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem.* 2002;50(9):2502-6.
128. Simone-Finstrom M, Spivak M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees | SpringerLink. *Apidologie.* 2010;41(3):295-311.
129. Papachristoforou A, Koutouvela E, Menexes G, Gardikis K, Mourtzinos I. Photometric Analysis of Propolis from the Island of Samothraki, Greece. The Discovery of Red Propolis - Papachristoforou - 2019 - Chemistry & Biodiversity - Wiley Online Library. *Chemistry & Biodiversity.* 2019;16.
130. SEBRAE. Agronegócios: Produção de própolis - Estudo de mercado. Bahia - Brasil2017. 36 p.
131. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008;5(3):313-6.
132. Franchin M, Freires IA, Lazarini JG, Nani BD, da Cunha MG, Colon DF, et al. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chem.* 2018;153:49-55.
133. YongKun P, Ikegaki M, Alencar SMd, Moura FFd. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybee Science.* 2000;21(2):85-90.
134. Orsi R, Sforcin J, Rall V, Funari S, Barbosa L, Fernandes J. Susceptibility profile of *Salmonella* against the antibacterial activity of propolis produced in two regions of Brazil. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases.* 2005;2(2).
135. Alencar SMd, Aguiar CLd, Paredes-Guzman J, Park YK. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. *Ciência Rural.* 2005;35.
136. Piccinelli AL, Lotti C, Campone L, Cuesta-Rubio O, Campo Fernandez M, Rastrelli L. Cuban and Brazilian red propolis: botanical origin and comparative analysis by high-performance liquid chromatography-photodiode array detection/electrospray ionization tandem mass spectrometry. *J Agric Food Chem.* 2011;59(12):6484-91.
137. Mishima S, Yoshida C, Akino S, Sakamoto T. Antihypertensive Effects of Brazilian Propolis: Identification of Caffeoylquinic Acids as Constituents Involved in the Hypotension in Spontaneously Hypertensive Rats. *Biological and Pharmaceutical Bulletin.* 2005;28(10):1909-14.
138. Arruda C, Ribeiro VP, Almeida MO, Mejía JAA, Casoti R, Bastos JK. Effect of light, oxygen and temperature on the stability of artepillin C and p-coumaric acid from Brazilian green propolis. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2020;178.
139. Costa P, Almeida MO, MarivaneLemos, Arruda C, Casoti R, Somensi LB, et al. Artepillin C, drupanin, aromadendrin-4'-O-methyl-ether and kaempferide from Brazilian green propolis promote gastroprotective action by diversified mode of action. *Journal of Ethnopharmacology.* 2018;226:82-9.

140. Endo S, Hoshi M, Matsunaga T, Inoue T, Ichihara K, Ikari A. Autophagy inhibition enhances anticancer efficacy of artepillin C, a cinnamic acid derivative in Brazilian green propolis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2018;497(1):437-43.
141. Daugsch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian Red Propolis—Chemical Composition and Botanical Origin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008;5(4):435-41.
142. Sinott FA, Sena-Lopes A, Leal KS, Thais de Oliveira Silva M, Cardoso de Freitas M, Quintana de Moura M, et al. Essential oil from Brazilian Red Propolis exhibits antihelmintic activity against larvae of *Toxocara cati*. *Exp Parasitol*. 2019;200:37-41.
143. Sena-Lopes A, Bezerra FSB, das Neves RN, de Pinho RB, Silva MTO, Savegnago L, et al. Chemical composition, immunostimulatory, cytotoxic and antiparasitic activities of the essential oil from Brazilian red propolis. *PLoS One*. 2018;13(2):e0191797.
144. Frozza COS, Garcia CSC, Gambato G, Souza MD, Salvador M, Moura S, et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol*. 2013; 52: 137-42.
145. Toreti VC, Sato HH, Pastore GM, Park YK. Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:697390.
146. de Groot AC. Propolis: a review of properties, applications, chemical composition, contact allergy, and other adverse effects. *Dermatitis*. 2013;24(6):263-82.
147. Pellati F, Prencipe FP, Bertelli D, Benvenuti S. An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. *J Pharm Biomed Anal*. 2013;81-82:126-32.
148. Mendonça KF, Carneiro JKR, Oliveira MAS. Atividade antimicrobiana in vitro do extrato aquoso, hidroalcoólico e alcoólico de folhas de espécies da família *Lamiaceae*. *Rev Pre Infec e Saúde*. 2018;4.
149. Mahmoud SS, ElAbrak ES, Aly MA, Ali EM. Oculohypotensive effects of various acetozolamide nanopreparations for topical treatment of animal model-induced glaucoma and their impact on optic nerve. *PLoS One*. 2019;14(2):e0212588.
150. Fischer G, Hübner S, Vargas G, Vidor T. Imunomodulação pela própolis. *Arq Inst Biol*. 2008;75(2):247-53.
151. Orsolic N, Knezevic AH, Sver L, Terzic S, Basic I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. *J Ethnopharmacol*. 2004;94(2-3):307-15.
152. Nassar SA, Mohamed AH, Soufy H, Nasr SM, Mahran KM. Immunostimulant effect of Egyptian propolis in rabbits. *Scientific World Journal*. 2012;2012:901516.
153. Falcão SI, Calhelha RC, Touzani S, Lyoussi B, Ferreira ICFR, Vilas-Boas M. In Vitro Interactions of Moroccan Propolis Phytochemical's on Human Tumor Cell Lines and Anti-Inflammatory Properties. *Biomolecules*. 2019;9(8):315.
154. Frion-Herrera Y, Gabbia D, Diaz-Garcia A, Cuesta-Rubio O, Carrara M. Chemosensitizing activity of Cuban propolis and nemorosone in doxorubicin resistant human colon carcinoma cells. *Fitoterapia*. 2019;136:104173.

155. El-Guendouz S, Lyoussi B, Lourenço JP, Costa AMRd, Miguel MG, Dias CB, et al. Magnetite nanoparticles functionalized with propolis against methicillin resistant strains of *Staphylococcus aureus*. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers. 2019;102:25-33.
156. González-Búrquez MdJ, González-Díaz FR, García-Tovar CG, Carrillo-Miranda L, Soto-Zárate CI, Canales-Martínez MM, et al. Comparison between In Vitro Antiviral Effect of Mexican Propolis and Three Commercial Flavonoids against Canine Distemper Virus. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine. 2018.
157. Hochheim S. Determination of phenolic profile by HPLC-ESI-MS/MS, antioxidant activity, in vitro cytotoxicity and anti-herpetic activity of propolis from the Brazilian native bee *Melipona quadrifasciata*. Revista Brasileira de Farmacognosia. 2019;29(3):339-50.
158. Cortés-Higareda M, Ramos-García MdL, Correa-Pacheco ZN, Río-García JCD, Bautista-Baños S. Nanostructured chitosan/propolis formulations: characterization and effect on the growth of *Aspergillus flavus* and production of aflatoxins. Heliyon. 2019;5(5).
159. Djais AA, Jemmy, Putri N, Putri AR, Darwita RR, Bachtiar BM. Biofilm formation of *Candida Albican* Exposed To Ethanol Extract of Propolis. International Journal of Applied Pharmaceutics. 2019;11(1).
160. Y S, T S. Brazilian propolis extract reduces intestinal barrier defects and inflammation in a colitic... - Abstract - Europe PMC. Nutrition Research. 2019;69:30-41.
161. Palaniappan K, Holley RA. Use of natural antimicrobials to increase antibiotic susceptibility of drug resistant bacteria. Int J Food Microbiol. 2010;140(2-3):164-8.
162. Chen M, Zhao Y, Yu S. Optimisation of ultrasonic-assisted extraction of phenolic compounds, antioxidants, and anthocyanins from sugar beet molasses. Food Chem. Elsevier; 2015;172: 543–550.
163. Woisky RG, Salatino A. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. Journal Apic Research. 1998; 37(2): 99-105.
164. Marcucci MC, et al. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. Journal of Ethnopharmacology. 2001, 74: 105-112.
165. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin Journal of Science and Technology. 2004, 26(2).
166. ISO 10272-1:2017. Microbiology of the food chain: Horizontal method for detection and enumeration of *Campylobacter* spp. Part 1: Detection method. 2017.
167. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GM, Murata RM, Yatsuda R, et al. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans *Streptococci*. Curr Microbiol. 2000;41(3):192-6.
168. Standards NCfCL. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (M100-S10 (M7). Wayne: NCCLS; 2000.
169. Yuan Y, Zheng S, Zeng L, Deng Z , Zhang B, Hongyan L. The Phenolic Compounds, Metabolites, and Antioxidant Activity of Propolis Extracted by Ultrasound-Assisted Method. Journal of Food Science. 2019; 84(12): 3850-3965.

170. Ferrera TS, Heldwein AB, Dos Santos CO, Somavilla JC; Sautter, CK. Substâncias fenólicas, flavonoides e capacidade antioxidantem em ervaíeras sob diferentes coberturas do solo e sombreamentos. Rev. Bras. Pl. Med. 2016; 18(2):588-596.
171. Pobiega K, Krasniewska K, Derewiaka D, Gniewosz M. Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. J Food Sci Technol. 2019; 56(12): 5386–5395. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04009-9>
172. Boisard S, et al. Antifungal and antibacterial metabolites from a French poplar type propolis. Evid. Based Complement. Altern. Med. 2015.
173. Cottica SM, Sabik H, Antoine C, Fortin J, Graveline N, Visentainer JV., et al. Characterization of Canadian propolis fractions obtained from two-step sequential extraction. LWT—Food Sci Technol. 2015; 60: 609-614. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.08.045> 52.
174. Jug M, Končić MZ, Kosalec I. Modulation of antioxidant, chelating and antimicrobial activity of poplar chemo-type propolis by extraction procures. LWT—Food Sci Technol. 2014; 57: 530-537. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.02.006> 53.
175. Taddeo VA, Epifano F, Fiorito S, Genovese S. Comparison of different extraction methods and HPLC quantification of prenylated and unprenylated phenylpropanoids in raw Italian propolis. J Pharm Biomed Anal. 2016; 129: 219-223. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2016.07.006> PMID: 2742937.
176. Darendelioglu E, Aykutoglu G, Tartik M, Baydas G. Turkish propolis protects human endothelial cells in vitro from homocysteine-induced apoptosis. Acta Histochem. 2016; 118: 369-376. <https://doi.org/10.1016/j.acthis.2016.03.007> PMID: 27085254.
177. Cao J, Peng L-Q, Du L-J, Zhang Q-D, Xu J-J. Ultrasound-assisted ionic liquid-based micellar extraction combined with microcrystalline cellulose as sorbent in dispersive microextraction for the determination of phenolic compounds in propolis. Anal Chim Acta. 2017; 963: 24-32. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2017.01.063> PMID: 28335972.
178. Pellati F, Prencipe FP, Bertelli D, Benvenuti S. An efficient chemical analysis of phenolic acids and flavonoids in raw propolis by microwave-assisted extraction combined with high-performance liquid chromatography using the fused-core technology. J Pharm Biomed Anal. 2013; 81-82: 126-132. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2013.04.003> PMID: 23644907.
179. Briones-Labarca V, Plaza-Morales M, Giovagnoli-Vicuña C, Jamett F. High hydrostatic pressure and ultrasound extractions of antioxidant compounds, sulforaphane and fatty acids from Chilean papaya (*Vasconcellea pubescens*) seeds: Effects of extraction conditions and methods. LWT—Food Sci Technol. 2015; 60: 525-534. <https://doi.org/10.1016/J.LWT.2014.07.057>.
180. Sallet D, Souza PO, Fischer LT, Ugalde G, Zabot GL, Mazutti MA, et al. Ultrasound-assisted extraction of lipids from *Mortierella isabellina*. J Food Eng. 2019; 242: 1-7. <https://doi.org/10.1016/J.JFOODENG.2018.08.015>.
181. Andrade JKS, Denadai M, de Oliveira CS, Nunes ML, Narain N. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. Food Res Int. 2017; 101: 129-138. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.08.066> PMID: 28941675.

182. Andrade JKS, Denadai M, Andrade GRS, da Cunha Nascimento C, Barbosa PF, Jesus MS, et al. Development and characterization of microencapsules containing spray dried powder obtained from Brazilian brown, green and red propolis. *Food Res Int.* 2018; 109: 278-287. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.04.048> PMID: 29803451 66.
183. Marquele FD, et al. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.* 2005; 39: 455–462.
184. Hata T, Tazawa S, Ohta S, Rhyu MR, Misaka T, Ichihara, K . Artepillin C, a major ingredient of Brazilian propolis, induces a pungent taste by activating TRPA1 channels. *PloS one.* 2012; 7(11): e48072. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0048072>
185. Silva JC, Rodrigues S, Feás, X, Estevinho, LM. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food and chemical toxicology.* 2012; 50(5): 1790-5.
186. Benicio, CG. Caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella enterica* de origem avícola e atividade antimicrobiana de extratos de própolis. [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2019.
187. Maia, LM. Potencial antimicrobiano da própolis verde sobre *Salmonella enterica* subsp. *enterica*. [tese]. Goiâna: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2020.
188. Kujumgiev A, et al. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J. Ethnopharmacol.* 1999; 64: 235–240.
189. Sforcin JM, et al. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 2000; 73: 243–249.
190. Uzel A, et al. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiological Research.* 2005; 160: 189-195.
191. Delcour AH. Outer membrane permeability and antibiotic resistance. *Biochim Biophys Acta.* 2009;1794(5):808-16.
192. Rufatto LC, Luchtenberg P, Garcia C, Thomassigny C, Bouttier S, Henriques JAP, et al. Brazilian red propolis: Chemical composition and antibacterial activity determined using bioguided fractionation. *Microbiology Research.* 2018;214:74-82.
193. Meinersmann RJ, Patton CM, Evins GM, Wachsmuth IK, Fields PI. Genetic diversity and relationships of *Campylobacter* species and subspecies. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2002;52(Pt 5):1789-97.
194. Endtz HP, Vliegenthart JS, Vandamme P, Weverink HW, Braak NPvd, Verbrugh HA, et al. Genotypic diversity of *Campylobacter lari* isolated from mussels and oysters in The Netherlands. *International Journal of Food Microbiology.* 1997;34(1).
195. Wilson D, Rathinam V, Qi. W, Wick L, Landgraf J, Bell J, et al. Genetic diversity in *Campylobacter jejuni* is associated with differential colonization of broiler chickens and C57BL/6J IL10-deficient mice. *Microbiology.* 2010;156(Pt 7):2046-57.
196. Rios JL, Recio MC, Villar A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. *J Ethnopharmacol.* 1988;23(2-3):127-49.

197. Hussain AI, Anwaar F, Nigam PS, Sarker SD, Moore JE, et al. Antibacterial activity of some *Lamiaceae* essential oils using resazurin as an indicator of cell growth. LWT - Food Science and Technology. 2011; 44(4): 1199-1206.
198. Silva AC, Iacuzio R, Cândido TJS, Rodrigues MX, Silva NCC et al. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isolados de carcaças de frangos: resistência a antibióticos e óleos essenciais. Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS). 2018; 8(1): 95-103.
199. Roca BM, Poester VR, Mattei AS, Klafke GB, Ramis IB, et al. Avaliação do uso da resazurina em teste de suscetibilidade in vitro frente a *Sporothrix brasiliensis*. Vittalle – Revista de Ciências da Saúde. 2019; 31(2): 32-37.