

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

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Salmonella*  
*enterica* DE ORIGEM AVÍCOLA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA  
DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS**

Cristyene Gonçalves Benicio  
Orientadora: Prof Dr<sup>a</sup> Cíntia Silva Minafra e Rezende

GOIÂNIA  
2019



**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 ressarcimento 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.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       Dissertação       Tese

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**


Nome completo do autor: Cristyene Gonçalves Benicio

Título do trabalho: Caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella enterica* de origem avícola e atividade antimicrobiana de extratos de própolis

**3. Informações de acesso ao documento:**

Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.

  
 Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:

  
 Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 03 / 01 / 2020

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados 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.

<sup>2</sup> A assinatura deve ser escaneada.

CRISTYENE GONÇALVES BENICIO

**CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Salmonella enterica* DE ORIGEM AVÍCOLA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS**

Tese apresentada para obtenção do título de Doutor em Ciência Animal junto à Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás

**Área de concentração:**

Sanidade Animal, Higiene e Tecnologia de Alimentos

**Linha de Pesquisa:**

Segurança Alimentar

**Orientadora:**

Prof Dr<sup>a</sup> Cíntia Silva Minafra e Rezende - EVZ/UFG

**Comitê de Orientação:**

Prof Dr<sup>a</sup> Maria Auxiliadora Andrade - EVZ/UFG

Dr<sup>a</sup> Bruna Aparecida Souza Machado - SENAI/CIMATEC

GOIÂNIA

2019

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

Benicio, Cristyene Gonçalves

Caracterização fenotípica e genotípica de Salmonella enterica de origem avícola e atividade antimicrobiana de extratos de própolis [manuscrito] / Cristyene Gonçalves Benicio. - 2019.  
xv, 85 f.: il.

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

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia (EVZ), Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, Goiânia, 2019.

Bibliografia.

Inclui siglas, gráfico, tabelas, lista de figuras, lista de tabelas.

1. Antibiograma. 2. Bactericida. 3. Bacteriostático. 4. Resistência. 5. Sorotipificação. I. Rezende, Dra Cíntia Silva Minafra e, orient. II. Título.

CDU 664



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ATA DE DEFESA DE TESE**

Ata Nº 276 da sessão de Defesa de Tese de Cristyene Gonçalves Benício que confere o título de Doutora em **Ciência Animal**, na área de concentração em **Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de Alimentos**.

Aos **vinte e um dias do mês de novembro de dois mil e dezenove** a partir das **14h00min**, no auditório (sala 03) da Pós-Graduação da Escola de Veterinária e Zootecnia da UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Tese intitulada **“AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE PRÓPOLIS EM SOROTIPOS DE *Salmonella enterica* DE ORIGEM AVÍCOLA”**. Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, Prof.ª Dr.ª **Cintia Silva Minafra e Rezende (EVZ/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: Prof. Dr. **Moacir Evandro Lage (EVZ/UFG)**, membro titular interno; Prof. Dr. **Weslen Fabricio Pires Teixeira (EVZ/UFG)**, membro titular interno; Prof. Dr. **Cristiano Sales Prado (EVZ/UFG)**, membro titular externo ao programa; Prof.ª Dr.ª **Liana Jayme Borges (Fanut/UFG)**, membro titular externo ao programa. Durante a arguição os membros da banca fizeram sugestão de alteração do título do trabalho conforme explicitado abaixo. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Tese tendo sido a candidata aprovada pelos seus membros. Proclamados os resultados pela 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 um dias do mês de novembro de dois mil e dezenove**.

**TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA**

Caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella enterica* de origem avícola e atividade antimicrobiana de extratos de própolis



Documento assinado eletronicamente por **Cintia Silva Minafra E Rezende**, Professora do Magistério Superior, em 21/11/2019, às 16:33, 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 **Liana Jayme Borges**, Professor do Magistério Superior, em 21/11/2019, às 16:35, 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 21/11/2019, às 16:35, 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 **Cristiano Sales Prado**, Professor do Magistério Superior, em 21/11/2019, às 16:36, 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 **Moacir Evandro Lage**, Professor do Magistério Superior, em 21/11/2019, às 16:38, 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\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **1010283** e o código CRC **76E6E811**.

À Deus, ao meu companheiro de jornada evolutiva terrena, ao meu pai, minha mãe (*in memoriam*) e demais familiares.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por me trazer oportunidades maravilhosas de aprimoramento pessoal e profissional. A minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cíntia Silva Minafra e Rezende, pela compreensão, conselhos, apoio, confiança, ensinamentos e exemplo. Aos meus pais, Ney e Sonia (*in memoriam*), por me proporcionarem todas as condições necessárias para estar aqui neste momento. A minha irmã Dr<sup>ª</sup>. Cristyane Gonçalves Benicio, pelo exemplo de dedicação aos estudos. A todos meus familiares que me ensinaram o quanto ter suporte nesta etapa da vida é indispensável. Ao meu companheiro Vitor Guimarães Silva pela compreensão e dedicação.

Aos professores da Escola de Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Goiás pela colaboração e apoio. Em especial, ao Prof. Dr. Edmar Soares Nicolau pela compreensão em relação à minha jornada de estudos e trabalho. A minha companheira de trabalho e amiga Daiana de Souza Fernandes pelos conselhos, por me tranquilizar e ouvir pacientemente minhas lamentações. A Dr<sup>ª</sup>. Bruna Aparecida Souza Machado do Centro Universitário SENAI CIMATEC na Bahia que tornou a realização deste estudo possível, gentilmente nos cedendo materiais de suma importância.

Aos colaboradores do Centro de Pesquisa em Alimentos que facilitaram a execução deste estudo. Em especial, ao Ervaldo Lourenço de Souza Sena pela amizade, compreensão, paciência e prestatividade nos momentos de angústia. Ao Magno Cândido da Silva Junior, à Claudia Ribeiro Borges Silva Oliveira e à Juliana Menna e Silva pela disponibilização de dados e materiais primordiais para execução deste estudo. As colaboradoras do setor de esterilização de materiais do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, Neuza Dias da Silva Souza, Lorena Aparecida Lopes, Agnalva Arruda Ferreira Gonçalves e Sandra Maria Pereira dos Santos, pela prestatividade e auxílio.

A toda equipe do Laboratório de Pesquisa Microbiológica do Centro de Pesquisa em Alimentos, em especial e com muito carinho à Úrsula Nunes Rauecker, Camila Silva de Carvalho Costa, Julierme José de Oliveira, Layane Martins Maia, Luíza Toffano Seidel Calazans, Thamara Venâncio de Almeida, Lohanne Franciele Damasceno Martins e Renata Teixeira Pfrimer por todo auxílio, amizade e paciência. Por fim, à Universidade Federal de Goiás, em especial ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal, por permitir esta valiosa experiência e a todos os cidadãos brasileiros que acreditam, confiam e indiretamente financiam a Ciência produzida nas instituições de ensino brasileiras. Muitíssimo obrigada!

*“Agradeço todas as dificuldades que enfrentei; não fosse por elas, eu não teria saído do lugar. As facilidades nos impedem de caminhar. Mesmo as críticas nos auxiliam muito.”*

*Chico Xavier*

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	xiv
<b>ABSTRACT</b> .....	xv
<b>CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS</b> .....	1
<b>1. Caracterização do gênero <i>Salmonella</i> sp</b> .....	1
<b>2. Salmonelose e saúde pública</b> .....	3
<b>3. <i>Salmonella</i> sp em produtos de origem avícola</b> .....	4
<b>4. Uso de antimicrobianos e surgimento de cepas multirresistentes</b> .....	6
<b>5. Própolis e suas aplicações</b> .....	9
5.1 Origem botânica.....	12
5.2 Composição química .....	13
5.3 Utilização para fins terapêuticos .....	13
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	15
<b>CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE <i>Salmonella</i> sp EM PRODUTOS AVÍCOLAS</b> .....	26
<b>RESUMO</b> .....	26
<b>ABSTRACT</b> .....	27
<b>1. Introdução</b> .....	28
<b>2. Material e Métodos</b> .....	31
<b>3. Resultados</b> .....	33
<b>4. Discussão</b> .....	48
<b>5. Conclusões</b> .....	56
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	57
<b>CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PRÓPOLIS FRENTE A <i>Salmonella</i> sp DE ORIGEM AVÍCOLA</b> .....	64
<b>RESUMO</b> .....	64
<b>ABSTRACT</b> .....	65
<b>1. Introdução</b> .....	66
<b>2. Material e Métodos</b> .....	68
<b>3. Resultados</b> .....	72
<b>4. Discussão</b> .....	76
<b>5. Conclusões</b> .....	79
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	80
<b>CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	85

## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 2

FIGURA 1 - Frequência (%) de resistência antimicrobiana dos 128 isolados de origem avícola e ambiental. CLO: cloranfenicol (30µg), FOS: fosfomicina (200µg), SUT: cotrimoxazol (25µg), AMC: amoxicilina-ácido clavulânico (30µg), CTF: ceftiofur (30µg), ENO: enrofloxacina (5µg), DOX: doxiciclina (30µg) e CIP: ciprofloxacina (5µg). .....36

### Capítulo 3

FIGURA 1 - Microplaca do sorotipo testado mais suscetível (*Salmonella* Senftenberg) após 24 horas de incubação e adição da solução de resazurina. As colunas de 2 a 11 correspondem respectivamente às seguintes diluições de cada extrato: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,8; 0,4 e 0,2 mg/mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A coluna 1 representa o controle de coloração do extrato frente ao corante (ausência do microrganismo com adição do extrato da própolis). 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. ....75

## LISTA DE TABELAS

### Capítulo 2

TABELA 1 - Descrição das amostras avícolas utilizadas no estudo .....	31
TABELA 2 - Ocorrência dos sorotipos de <i>Salmonella</i> identificados .....	33
TABELA 3 - Origem dos sorotipos de <i>Salmonella</i> identificados.....	35
TABELA 4 - Perfis de resistência para os isolados avaliados.....	36
TABELA 5 - Perfil de suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos testados.....	39
TABELA 6 - Perfil genético dos isolados para os genes avaliados.....	44

### Capítulo 3

TABELA 1 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) dos extratos de diferentes amostras de própolis brasileiro obtidos por extração etanólica e ultrassônica em concentrações variando de 0,2 a 100mg/mL <sup>-1</sup> .....	72
TABELA 2 - Determinação de <i>Minimum Inhibitory Concentration</i> (MIC) e <i>Minimum Bactericidal Concentration</i> (MBC) dos extratos de própolis verde e vermelho da Bahia obtidos por extração etanólica e ultrassônica em concentrações variando de 0,2 a 100mg/mL <sup>-1</sup> .....	74

**LISTA DE QUADROS**

## Capítulo 1

QUADRO 1 - Classificação da própolis brasileira .....	11
---	----

## Capítulo 2

QUADRO 1 - Genes, sequência dos primers, tamanho de amplicom (pb), temperatura de <i>melting</i> (Tm) e referência .....	33
--	----

## Capítulo 3

QUADRO 1 - Extratos de própolis obtidos.....	69
QUADRO 2 - Isolados de <i>Salmonella</i> utilizados e suas respectivas fontes .....	69

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
Al	Alumínio
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
Ca	Cálcio
CDC	<i>Center for Disease Prevention and Control</i>
CGLAB	Coordenação Geral de Laboratórios de Saúde Pública
CIMATEC	Centro Integrado de Manufatura e Tecnologia
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
Cr	Crômio
Cu	Cobre
DIPOA	Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DVA	Doença Veiculada por Alimentos
ECDC	<i>European Centre for Disease Prevention and Control</i>
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
Fiocruz	Fundação Instituto Oswaldo Cruz
FoodNet	Foodborne Diseases Active Surveillance Network
H <sub>2</sub> S	Ácido sulfídrico
IOC	Instituto Oswaldo Cruz
ISO	<i>International Organization for Standardization</i>
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MBC	<i>Minimum Bactericidal Concentration</i>
Mg	Miligrama
MIC	<i>Minimum Inhibitory Concentration</i>
mL	Mililitro
Mn	Manganês
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de Sódio
Ni	Níquel
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
PFGE	<i>Pulsed-Field Gel Electrophoresis</i>
PIB	Produto Interno Bruto
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
PRP	Programa de Redução de Patógenos
RIISPOA	Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
SENAI	Serviço Nacional de Aprendizagem Industrial
SIF	Serviço de Inspeção Federal
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
EU	União Européia
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
UV	Ultravioleta
V	Vanádio
WGS	<i>Whole Genome Sequencing</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Zn	Zinco

## RESUMO

Objetivou-se com este estudo caracterizar fenotipicamente e genotipicamente isolados de *Salmonella* provenientes de amostras de origem alimentar e ambiental, além de avaliar a ação antibiótica *in vitro* de extratos de própolis verde e vermelha. Os 128 isolados de *Salmonella enterica* foram obtidos e analisados quanto à suscetibilidade antimicrobiana pelo método de difusão em disco. Os antimicrobianos e concentrações em microgramas testadas foram: amoxicilina-ácido clavulânico (30µg), cotrimoxazol (trimetropim-sulfametoxazol) (25µg), ciprofloxacina (5µg), enrofloxacina (5µg), ceftiofur (30µg), cloranfenicol (30µg), fosfomicina (200µg) e doxiciclina (30µg). As cepas *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram utilizadas como controle da qualidade dos testes de sensibilidade. Foram pesquisados dois genes de virulência e nove de resistência. Dentre os 128 isolados, 40 foram testados frente a ação da própolis. Os extratos de própolis diluídos em etanol foram avaliados quanto à sua atividade antimicrobiana nas concentrações de 0,2 a 100 mg/mL<sup>-1</sup> pela determinação da concentração inibitória e bactericida mínima. Foram encontrados 27 diferentes sorotipos, sendo os mais frequentes *Salmonella* Heidelberg, Saintpaul, Typhimurium e Minnesota. Verificou-se que 85,2% (109/128) dos isolados foram resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos utilizados e apenas cinco sorotipos não apresentaram resistência. Foram identificados 54 isolados multirresistentes. Dos oito antimicrobianos avaliados, para dois deles (cloranfenicol e fosfomicina) todos os isolados foram suscetíveis e aquele com maior número de isolados resistentes foi a ciprofloxacina. Dentre os genes de resistência avaliados (*bla*CTX-M e *gyrA*), cerca de 70% (89/128) dos isolados o albergavam. Em relação aos de virulência, três (*invA*, *hilA* e *sseD*) foram identificados em todos os isolados testados. Para os outros seis, *spvR* foi o que apresentou maior número de isolados nos quais não foi identificado. Dos 18 diferentes sorotipos testados frente a ação antibiótica da própolis, o mais suscetível foi *Salmonella* Senftenberg e os mais resistentes: Agona, Braenderup, Heidelberg, Infantis, Minnesota, Schwarzengrund, Newport, Orion, Saintpaul e Anatum. Em geral, os menores valores de concentração inibitória e bactericida mínima foram 3,1 mg/mL e 6,25 mg/mL, respectivamente. A melhor ação antimicrobiana foi da própolis vermelha, independentemente do tipo de extração utilizada para obtenção dos extratos. Sendo assim, a própolis pode ser uma alternativa viável como antimicrobiano sob *Salmonella* sp por possuir potencial de ação expressivo. Buscar alternativas para o tratamento e controle de microrganismos patogênicos tem sido importante mediante o surgimento de cepas multirresistentes.

**Palavras-chave:** antibiograma, bactericida, bacteriostático, resistência e sorotipificação.

## ABSTRACT

The objective of this study was to characterize phenotypically and genotypically *Salmonella* isolates from food and environmental samples, as well as to evaluate the *in vitro* antibiotic action of green and red propolis extracts. The 128 isolates of *Salmonella enterica* were obtained and analyzed for antimicrobial susceptibility by disk diffusion method. The antimicrobials and microgram concentrations tested were: amoxicillin-clavulanic acid (30µg), cotrimoxazole (trimetropim-sulfamethoxazole) (25µg), ciprofloxacin (5µg), enrofloxacin (5µg), ceftiofur (30µg), chloramphenicol (30µg), chloramphenicol (30µg) and doxycycline (30µg). *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) and *Escherichia coli* (ATCC 25922) strains were used as a quality control of the sensitivity tests. Two genes of virulence and nine of resistance were searched. Among the 128 isolates, 40 were tested against propolis action. Propolis extracts diluted in ethanol were evaluated for their antimicrobial activity ranging from 0.2 to 100 mg/mL<sup>-1</sup> by determining the minimum inhibitory and bactericidal concentration. We found 27 different serotypes, the most common was *Salmonella* Heidelberg, Saintpaul, Typhimurium and Minnesota. It was found that 85.2% (109/128) of the isolates were resistant to one or more antimicrobial agents used and only five serotypes showed no resistance. We identified 54 multiresistant isolates. Of the eight antimicrobials evaluated, for two of them (chloramphenicol and phosphomycin) all isolates were susceptible and the one with the largest number of resistant isolates was ciprofloxacin. Among the resistance genes evaluated (*bla*CTX-M and *gyrA*), about 70% (89/128) of the isolates harbored it. Regarding virulence genes, three (*invA*, *hila* and *sseD*) were identified in all isolates tested. For the other six, *spvR* presented the highest number of isolates in which it was not identified. Of the 18 different serotypes tested against antibiotic action of propolis, the most susceptible were *Salmonella* Senftenberg and the most resistant: Agona, Braenderup, Heidelberg, Children, Minnesota, Schwarzengrund, Newport, Orion, Saintpaul and Anatum. In general, the lowest inhibitory and minimum bactericidal concentration values were 3.1 mg / mL and 6.25 mg/mL, respectively. The best antimicrobial action was for red propolis, regardless of the type of extraction used to obtain the extracts. Thus, propolis may be a viable alternative as antimicrobial under *Salmonella* sp because it has expressive action potential. Seeking alternatives for the treatment and control of pathogenic microorganisms has been important through the emergence of multiresistant strains.

**Keywords:** antibiogram, bactericidal, bacteriostatic, resistance and serotyping.

## CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES INICIAIS

### 1. Caracterização do gênero *Salmonella* sp

O gênero *Salmonella* recebeu esta denominação em homenagem ao cientista americano Daniel Elmer Salmon que, em parceria com Theobald Smith, isolaram e descreveram pela primeira vez em 1885 o que chamaram de bacilo da peste suína<sup>1,2</sup>. Posteriormente, este agente foi denominado *Salmonella Cholerasuis* e tem sido reconhecido como agente da doença há mais de 130 anos<sup>3,4</sup>.

Uniformizar a nomenclatura deste gênero é importante e necessário para facilitar a comunicação entre cientistas, autoridades de saúde e a comunidade. No entanto, devido à complexidade de sua taxonomia, diferentes sistemas foram utilizados para o definir e classificar. Apenas em 1970 se alcançou considerável progresso em relação a uniformização de sua nomenclatura<sup>5</sup>, de forma tal que atualmente ao descrever um sorotipo de *Salmonella* seu gênero aparece em itálico seguido por seu sorotipo grafado sem itálico com a primeira letra em maiúsculo. Normalmente não é descrita a espécie à qual pertence o sorotipo, caso opte-se por descrever espécie e subespécie deverão estar escritos em itálico.

A análise sorológica de antígenos somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) foi iniciada nos anos 20 por White e, posteriormente, expandida por Kauffmann, definindo os diferentes sorotipos como espécies<sup>6,7</sup>. O gênero *Salmonella* contém mais de 2.600 sorotipos e a maioria destes foram identificados a partir de isolados do grupo I (*enterica*)<sup>8,9</sup>. Estudos fenotípicos e genotípicos realizados a partir de 1970 resultaram em diferentes propostas taxonômicas, visando a redução do crescente número de espécies<sup>10,11,12</sup>.

A aplicação de métodos moleculares associada a testes bioquímicos, permitiu que uma análise taxonômica mais apurada fosse realizada para o gênero, classificando-o em duas espécies: *Salmonella enterica* descoberta por Gartner em 1888<sup>13</sup> e *Salmonella bongori*<sup>12</sup>. *Salmonella enterica* foi então subdividida em seis subespécies ou grupos (*enterica*- grupo I, *salamae*- grupo II, *arizonae*-grupo IIIa, *diarizonae*- grupo IIIb, *houtenae*- grupo V, *indica*-grupo VI)<sup>8,14,15</sup>. Uma terceira espécie isolada de sedimento coletado em região aquífera, *Salmonella subterranea*, foi identificada no ano de 2004; porém, sua inclusão não foi aceita por todos os órgãos internacionais<sup>16</sup>, provavelmente em virtude de que sua sequência de DNA ribossomal mostrou similaridade de 96,4% com *Salmonella bongori*<sup>17</sup>. A nomenclatura com base na caracterização antigênica tem sido adotada por vários centros de referência internacionais para sorotipificação de *Salmonella* sp<sup>7,15,18</sup>.

Outra classificação utilizada para esse microrganismo baseia-se na especificidade do hospedeiro, determinação do padrão clínico e prevalência, dividindo-os em três categorias: 1) salmonelas adaptadas ao homem: *Salmonella* Sendai, *Salmonella* Typhi e *Salmonella* Paratyphi A, B e C agentes da febre enterica; 2) adaptadas aos animais: *Salmonella* Dublin (bovinos), *Salmonella* Choleraesuis e *Salmonella* Typhisuis (suínos), *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum (aves) causadoras da pulrose e tifo aviário, *Salmonella* Abortus-ovis (ovinos) e *Salmonella* Abortus-equi (equinos); e 3) salmonelas zoonóticas que incluem sorotipos ubíquos que afetam homens e animais, normalmente isoladas de animais domésticos e silvestres causando quadros de infecções alimentares<sup>7,19</sup>. Salmonelas também são classificadas em tifóides e não tifóides ou paratíficas<sup>20</sup>. *Salmonella enterica* subsp. *enterica* Typhi e Paratyphi pertencem ao grupo de salmonelas tifóides e têm o homem como reservatório. Já o grupo das salmonelas paratíficas é composto por diversos sorotipos de *Salmonella* sp detectados a partir do ambiente e do trato gastrointestinal dos animais<sup>21</sup>.

As bactérias do gênero *Salmonella* pertencem à família *Enterobacteriaceae*, possuem o formato de bacilos curtos, largura de 0,4 a 1,5  $\mu\text{m}$  e comprimento de 2 a 5  $\mu\text{m}$ <sup>22,23</sup>. A maioria são móveis através de flagelos peritríquios e produzem ácido e gás ( $\text{H}_2\text{S}$ ) a partir da fermentação da glicose; exceto *Salmonella* Pullorum e *Salmonella* Gallinarum que são imóveis e menos de 5% produzem gás<sup>24,25</sup>.

As características bioquímicas comumente apresentadas por elas são: coloração Gram-negativa, redução de nitrato a nitrito, reação de oxidase negativa, hidrólise variável da arginina, não desaminação do triptofano e da fenilalanina, não produção de indol e utilização do citrato como única fonte de carbono pela maioria das cepas<sup>26,27</sup>. Apresentam ainda como características metabólicas bem definidas a capacidade de descarboxilação da lisina e ornitina<sup>23</sup>, sendo o teste de lisina descarboxilase utilizado para distinguir espécies de *Salmonella* sp de bactérias do gênero *Proteus*, que não apresentam essa enzima<sup>28</sup>; assim como o teste de ureia, já que este componente não é hidrolisado pelo gênero *Salmonella* enquanto o gênero *Proteus* produz urease<sup>29</sup>. Caracterizam-se ainda por não formarem esporos nem cápsulas, serem anaeróbios facultativos, catalase positivos, *Voges Proskauer* negativos e vermelho de metila positivos<sup>23,30</sup>.

Essas bactérias possuem em sua estrutura lipopolissacarídeos, flagelos, fímbrias e algumas proteínas da membrana externa que atuam na adesão e/ou invasão do epitélio do trato intestinal<sup>31</sup>. A maioria exhibe numerosas fímbrias para aumentar a capacidade de fixação a vários substratos<sup>32</sup>. Representa um grupo com características morfológicas e bioquímicas homogêneas, entretanto, algumas delas podem ser alteradas por aquisição de plasmídeos ou

por mutações, já que alguns sorotipos de *Salmonella* sp podem apresentar exceções para características comuns do gênero<sup>7</sup>.

## 2. Salmonelose e saúde pública

O gênero *Salmonella* está amplamente difundido geograficamente em todo mundo devido à sua capacidade de sobreviver no meio ambiente e a existência de animais portadores, favorecendo sua distribuição<sup>3</sup>. A constituição genética desta bactéria permite sua adaptação a uma variedade de ambientes e animais, incluindo hospedeiros mamíferos e não-mamíferos<sup>33</sup>, sendo seu principal *habitat* o trato intestinal. Pode-se citar como as principais fontes de *Salmonella* sp no ambiente a água, o solo, as fezes de animais, os insetos e ratos, e as superfícies de equipamentos e utensílios de fábricas e cozinhas. Esta variedade de reservatórios e fontes de transmissão contribuem para a alta prevalência da infecção humana<sup>34</sup>. Apesar da evolução tecnológica ocorrida nos últimos anos nos setores relacionados à indústria de alimentos, tem-se registrado aumento na incidência de surtos de salmoneloses em alguns países. Este microrganismo exerce papel relevante em saúde pública, em função da capacidade de contaminar os animais, tornando-os portadores assintomáticos e capazes de contaminar o ambiente e os alimentos<sup>21</sup>.

A salmonelose é uma doença de origem alimentar importante causada por *Salmonella* sp e considerada um problema de saúde pública a nível mundial<sup>35,36</sup>, devido a sua alta incidência e gravidade<sup>37</sup>. Juntamente com *Campylobacter* spp. e *Escherichia coli* são consideradas as causas mais frequentes das doenças de origem alimentar<sup>38,39,40</sup>. Existem quatro formas de infecção por *Salmonella* sp: gastroenterite, sepse, febre entérica e colonização assintomática<sup>41</sup>. Os principais sintomas destas infecções incluem desconfortos abdominais, cólicas, febre, náuseas, vômito e dor de cabeça<sup>42</sup>. Segundo dados do Instituto Oswaldo Cruz<sup>43</sup>, sorotipos de *Salmonella* sp podem causar desde quadros leves de infecção até sinais mais graves como septicemia, febre entérica e morte. De 1 a 5% dos casos a salmonelose podem causar doença sistêmica, a qual pode ser fatal, se não tratada<sup>44</sup>.

Nos animais, além das manifestações clínicas humanas, como diarreia e septicemia causadas por sorotipos ubiqüitários, também podem ocorrer abortos em bovinos e equinos, pulorose e tifo em aves e outras manifestações devido aos sorotipos adaptados a hospedeiros específicos<sup>45,46</sup>. Quando os sorotipos causadores das doenças anteriormente citadas acometem humanos, o processo é geralmente invasivo e, muitas vezes, fatal<sup>47,48</sup>. No entanto, a maioria dos sorotipos não são adaptados a hospedeiros específicos e causam

infecções subclínicas em hospedeiros portadores, e estes representam os principais causadores da salmonelose em humanos<sup>49</sup>.

De acordo com dados coletados pelo Ministério da Saúde, de 2000 a 2015, 10.666 surtos de doença diarreica foram notificados envolvendo 209.240 pessoas. Os principais agentes etiológicos identificados associados a esses surtos foram *Salmonella* sp e *E. coli*<sup>37,50</sup>. Entre 2014 e 2017, o Sistema de Vigilância Epidemiológica de Doenças Veiculadas por Alimentos (DVA's), do Ministério da Saúde, informou a notificação de 85 surtos relacionados à infecção por *Salmonella* sp, com a ocorrência de 3.433 doentes e dois óbitos registrados<sup>51</sup>. Ainda de acordo com o Ministério da Saúde, em 2018 foram notificados 503 surtos de DVA's, dos quais, nove (0,1%) levaram a óbito. Dentre os surtos ocorridos de 2009 a 2018, *Salmonella* sp foi considerado o segundo principal agente etiológico envolvido, ocorrendo em 11,3% destes surtos<sup>52</sup>.

No Brasil, nem todas as unidades federais dispõem de dados concisos de vigilância epidemiológica quanto a DVA's, podendo assim a ocorrência de surtos serem maiores do que o descrito. Gantois et al<sup>53</sup> acreditavam que a subnotificação dos casos deste tipo de doença dificulta o conhecimento da dimensão do problema e a tomada de decisões efetivas com o objetivo de trazer soluções, situação ainda observada atualmente.

### **3. *Salmonella* sp em produtos de origem avícola**

A infecção por *Salmonella* sp em aves pode causar três doenças distintas: pulorose (*Salmonella Pullorum*), tifo aviário (*Salmonella Gallinarum*) e paratifo aviário (causado pelos demais sorotipos)<sup>54</sup>. A pulorose e o tifo aviário geram quadros clínicos graves que, na maioria das vezes, levam a eliminação dos lotes infectados. A infecção acarreta graves perdas econômicas para a indústria avícola devido à alta mortalidade, baixa produtividade, custos elevados com medicamentos, pintos de má qualidade e gastos com a erradicação e controle da enfermidade<sup>55</sup>.

As aves podem se infectar por diferentes sorotipos de *Salmonella* sp e não apresentarem sinais clínicos sendo portadoras assintomáticas e atuando como reservatórios no ambiente<sup>56</sup>, o que caracteriza o grande embate desta zoonose. As formas clínicas inaparentes, denominadas infecções paratíficas, são responsáveis por queda da produtividade do plantel quando existentes e contaminação silenciosa do ambiente<sup>57,58</sup>.

Diversas são as fontes de infecção das aves e de seus produtos por *Salmonella* sp<sup>59</sup>. A presença de roedores que possuem fácil acesso ao local de armazenamento das rações

pode contaminar, com suas fezes, o alimento fornecido aos animais de criação<sup>60</sup>. Amostras ambientais provenientes do aviário tais como: poeira, cama e fezes<sup>61,62</sup> também representam fontes de contaminação. Insetos como moscas<sup>63</sup> e o cascudinho (*Alphitobius diaperinus*)<sup>64</sup>, albergam diversas bactérias e estão em contato direto com as fezes das aves representando outro tipo de fonte. Ácaros (*Dermanyssus gallinae*) podem adquirir o patógeno ao picar a ave, e uma vez infectados, podem ser ingeridos por outras aves e infectá-las<sup>65</sup>. Aves selvagens e migratórias servem como reservatórios ou vetores mecânicos<sup>66,67,68</sup> deste patógeno. A reposição das aves, pela introdução de pintinhos infectados também representa uma fonte da infecção<sup>69</sup>.

Os frangos portadores de *Salmonella* sp podem contaminar as carcaças através de seu conteúdo gástrico ou fecal durante os procedimentos de abate<sup>70</sup>. Algumas etapas como escaldagem, depenagem e evisceração são reconhecidas como prováveis momentos de contaminação cruzada em abatedouros<sup>71,72</sup>. O processo de abate das aves gera resíduos sólidos (subprodutos) e líquidos, sendo alguns destinados à fabricação de farinhas de carne, penas e sangue pela maioria dos abatedouros e após processamento voltam à cadeia de produção avícola como ingredientes de ração<sup>73</sup>. Tendo as rações e suas matérias-primas, principalmente as de origem animal, altas taxas de contaminação por *Salmonella* sp, podem ser consideradas uma das principais fontes de introdução do patógeno nos plantéis<sup>74</sup>. Além disso, os subprodutos e águas residuais, quando descartados no ambiente sem o devido tratamento, também podem contaminar o solo, a vegetação, os rios e os animais<sup>73</sup>.

Diante desta problemática, o uso de métodos de controle de qualidade deve ser rotina para empresas avícolas brasileiras, buscando assim um rigoroso padrão de qualidade que se reflita na escolha do produto pelo consumidor e na conquista de novos mercados no país e no exterior. A preocupação com a sanidade dos plantéis deve ser constante nas granjas, incubatórios e abatedouros<sup>75</sup>. Qualquer alimento que contenha *Salmonella* sp é um risco potencial para o consumidor, cuja veiculação é facilitada, na atualidade, pela mudança nos hábitos alimentares da população. Para a prevenção da doença são necessárias medidas de controle em todas as etapas da fabricação de alimentos, desde a produção agrícola ou o ambiente de criação de animais e processamento do alimento na indústria até seu preparo nos estabelecimentos comerciais, residências e cozinhas industriais. O manuseio seguro da carne crua, bom cozimento e boa higiene podem prevenir ou reduzir o risco representado pelos alimentos contaminados<sup>48,76</sup>.

A prevenção da contaminação das aves apresenta, como fatores limitantes, a ampla distribuição da bactéria no ambiente e a existência frequente de portadores

assintomáticos<sup>21</sup>. No entanto, a adoção de medidas higiênico-sanitárias no manuseio e processamento das aves; o controle de rações e alimentos desses animais; a rígida adoção de práticas higiênicas na criação, transporte e abate; a distinta separação, em nível industrial, das operações com matérias-primas daquelas com produtos em processo ou terminados; a rigorosa adoção de programas de limpeza e desinfecção das instalações e equipamentos e a prevenção de contaminações cruzadas são medidas importantes que contribuem para a redução dos níveis de contaminação<sup>2</sup>. Sendo assim, para que se produza carne de frango segura é necessário que exista o controle sanitário de todos os segmentos do sistema produtivo<sup>77</sup>. Além dessas medidas, vale ressaltar a importância da manipulação dos alimentos, sendo fundamental o cozimento adequado e higienização dos utensílios<sup>59</sup>.

#### **4. Uso de antimicrobianos e surgimento de cepas multirresistentes**

Antimicrobianos são medicamentos que promovem a eliminação (bactericida) ou a inibição (bacteriostático) do crescimento de microrganismos, atuando em nível de parede celular, membrana plasmática, síntese de proteínas e ácidos nucleicos<sup>78,79</sup>. São comumente empregados na medicina humana em procedimentos terapêuticos contra infecções bacterianas primárias e, preventivamente, contra as possíveis infecções secundárias<sup>80,81</sup>.

Na medicina veterinária, antimicrobianos são adotados para controle de infecções em espécies animais domesticadas ou criadas para produção de produtos de origem animal<sup>82,83</sup>. A intensificação da pecuária usando antimicrobianos para terapêutica, profilaxia e promoção do crescimento em alguns países resultou no surgimento de resistência a estes medicamentos entre os microrganismos<sup>84,85</sup>. Além disso, seu uso de forma indiscriminada, ao selecionar linhagens bacterianas resistentes aos diferentes princípios ativos, pode dificultar o tratamento de infecções, tanto em humanos como nos animais<sup>86</sup>.

A resistência microbiana caracteriza-se como sendo a habilidade de um microrganismo continuar a se multiplicar ou persistir na presença de níveis terapêuticos de determinado agente antimicrobiano<sup>87</sup>. O desenvolvimento de resistência a antimicrobianos ocorre como qualquer processo natural de seleção em microrganismos<sup>82</sup>. Todavia, o aumento no uso destas substâncias nos ambientes hospitalares e em propriedades rurais, associadas a práticas de automedicação; contato de animais e produtos de origem animal com seres humanos; eliminação de microrganismos resistentes e de antimicrobianos no ambiente; bem como, diminuição no desenvolvimento de novos antimicrobianos; tornaram este tema um problema de saúde pública e animal em escala mundial<sup>81,82,88,89</sup>.

Dados do Centro de Controle de Doenças (CDC) dos Estados Unidos estimam que mais de 2 milhões de infecções são acometidas por bactérias resistentes, resultando em mais de 23.000 mortes por ano<sup>90</sup>. Estima-se que até 2050 tais infecções levarão à óbito cerca de 10 milhões de pessoas anualmente no mundo e os gastos com estas doenças poderão chegar a 100 trilhões de dólares anuais<sup>91</sup>.

A resistência a antibióticos é definida como a capacidade dos microrganismos de se proliferarem na presença de um antibiótico que deveria promover sua inibição ou eliminação<sup>92</sup>. As bactérias podem adquirir resistência por dois processos: transmissão vertical e horizontal. No primeiro as bactérias sofrem mutação no seu material genético capaz de lhes conferir resistência e sobrevivem ao uso da substância ou as bactérias sensíveis são eliminadas e as resistentes sobrevivem, transferindo esta característica às células-filhas. O segundo processo de desenvolvimento de resistência é a aquisição de genes transportados por bactérias já resistentes, muitas vezes de outro gênero<sup>93</sup>. Vários são os genes associados à resistência aos antibióticos pertencentes à variadas classes de antimicrobianos, estes podem ser transportados por elementos genéticos móveis, como transposons, integrons, plasmídeos ou fagos<sup>92</sup>.

O setor avícola enfrenta novas situações emergenciais relacionadas com a resistência antimicrobiana de patógenos em toda a cadeia de produção<sup>94</sup>. Um estudo norte americano<sup>95</sup> analisou os impactos ambientais e econômicos diante da retirada de antibióticos da produção de frangos de corte e concluíram que essa ação causaria reflexo negativo na produção, bem como prejuízo econômico. Assim, recomenda-se o uso responsável dos antimicrobianos na produção animal e não sua proibição. O uso controlado de antimicrobianos na produção animal e monitoramento constante de *Salmonella* sp na cadeia avícola são formas de contribuir com a saúde pública para reduzir a pressão de seleção. Estas medidas auxiliam a evitar a emergência e disseminação de sorotipos resistentes, garantindo também a eficácia clínica na utilização dos antimicrobianos<sup>96</sup>.

Em 2016, 60% das vendas domésticas de todos os antimicrobianos aprovados para uso na produção de alimentos corresponderam aos mesmos antimicrobianos de importância médica<sup>97</sup>. A resistência de alguns microrganismos, como *Salmonella* sp e *Campylobacter jejuni*, podem ter começado em animais produtores de alimentos<sup>98</sup>. Cepas multirresistentes de *Salmonella* sp estão associadas ao aumento da hospitalização, bem como às mortes e ao aumento no custo do tratamento da doença<sup>81</sup>. O surgimento de *Salmonella* sp multirresistente despertou a atenção de governos de todo o mundo<sup>2,99,100,101</sup>. Portanto, o monitoramento da resistência a *Salmonella* sp na cadeia avícola é essencial devido à possível disseminação de

isolados resistentes para humanos pelo consumo de alimentos contaminados, podendo levar ao fracasso da antibioticoterapia<sup>102</sup>.

Em alguns países, a indústria avícola utiliza promotores de crescimento (bases ativas em pequenas concentrações) com o objetivo de melhorar a produção de carne, através do aumento da conversão alimentar, promoção da taxa de crescimento e prevenção de doenças<sup>79</sup>. Determinados mercados selecionam seus fornecedores baseados na utilização deste tipo de estratégia, adquirindo produtos avícolas somente quando nenhum tipo de promotor de crescimento foi utilizado. Isto ocorre porque tal ação pode promover o aumento da resistência antimicrobiana em microrganismos relacionados a aves de criação, motivo de preocupação global. Ao monitorar a evolução da resistência antimicrobiana, tratamentos alternativos podem ser identificados e possíveis restrições no tratamento de infecções humanas sistêmicas previstas.

Foi realizada uma metanálise para avaliar o perfil e a evolução temporal da resistência antimicrobiana de *Salmonella* sp não tifoide de aves e origem humana no Brasil, isolada no período de 1995 a 2014<sup>103</sup>. Para os isolados não tifoídes de origem avícola, os maiores níveis de resistência antimicrobiana foram verificados para sulfonamidas (44,3%), ácido nalidíxico (42,5%) e tetraciclina (35,5%). Nos isolados de origem humana, a resistência ocorreu principalmente para sulfonamidas (46,4%), tetraciclina (36,9%) e ampicilina (23,6%). Com isto, observou-se que o monitoramento contínuo do desenvolvimento e disseminação da resistência antimicrobiana pode apoiar a mensuração das suas consequências para as criações de aves e a saúde humana.

Na avicultura, o uso de antimicrobianos não é recomendado em casos de infecções por salmonelas não invasivas em indivíduos saudáveis<sup>104,105</sup>. No entanto, em alguns casos, a antibioticoterapia pode ser necessária. Neste caso, a droga de escolha para o tratamento de infecções por *Salmonella* sp é a ciprofloxacina devido à sua atividade antimicrobiana de amplo espectro<sup>105</sup>. O uso extensivo de antimicrobianos levou a um número crescente de *Salmonella* não-tifoide resistente a quinolonas e com suscetibilidade reduzida a fluoroquinolonas<sup>106</sup>. Essa suscetibilidade reduzida pode levar a falhas no tratamento em alguns casos<sup>107</sup>.

As fluoroquinolonas e as cefalosporinas de terceira geração, que pertencem ao grupo dos betalactâmicos, são medicamentos considerados criticamente importantes por serem utilizados tanto na medicina humana quanto na medicina veterinária<sup>108</sup>; sendo administrados no tratamento de casos severos de salmonelose humana<sup>109</sup>, o que ressalta a

importância do monitoramento e controle da disseminação de cepas resistentes a estes medicamentos.

Além da preocupação com cepas multirresistentes, deve-se considerar também a patogenicidade do microrganismo. Tal característica está diretamente relacionada com a virulência do agente. Genes de virulência encontram-se na forma cromossômica ou plasmidial<sup>110</sup> e atuam em diferentes momentos da infecção<sup>111</sup>, sendo a maioria deles presentes nas ilhas de patogenicidade<sup>112,113</sup>. Acredita-se que durante a evolução dos microrganismos, trocas de material genético entre as bactérias, deleções e inserções em genes, tornaram alguns microrganismos mais patogênicos que outros<sup>114</sup>. As ilhas de patogenicidade de *Salmonella* sp contêm vários genes, com destaque para os de adesão (adesinas, *lpf*, *sefA*), invasão (*inv*, *agf*), inibição de respostas do hospedeiro (*pagC*, *spvC*) e resistência a antibióticos<sup>115</sup>.

Há necessidade crescente de encontrar alternativas eficazes para controlar doenças infecciosas e limitar a disseminação de bactérias resistentes, mas, mais importante, manter os antibióticos uma ferramenta útil para o futuro<sup>79</sup>. Sendo assim, outros antimicrobianos vêm sendo pesquisados<sup>116</sup> assim como alternativas ao seu uso nos ambientes de criação, incluindo o uso de probióticos, prebióticos, simbióticos, enzimas, ácidos orgânicos, imunoestimulantes, bacteriocinas, bacteriófagos, aditivos fitogênicos para alimentos, fitocídios, nanopartículas e óleos essenciais<sup>79,117</sup>. Estudos com o objetivo de identificar compostos com efeitos positivos na saúde e produtividade de frangos, têm se concentrado no uso de produtos naturais, como leite e própolis<sup>79</sup>.

Neste contexto, observa-se a necessidade de conhecer melhor os fatores de virulência e características de resistência de isolados de *Salmonella* oriundos de produtos de origem avícola e ambiental. Tais informações facilitarão o entendimento da epidemiologia do patógeno e o estabelecimento de parâmetros para avaliar os riscos que representam para a saúde pública, subsidiando os órgãos competentes sobre as políticas de qualidade necessárias para o gerenciamento destes riscos e controle do patógeno no país.

## **5. Própolis e suas aplicações**

De acordo com a Instrução Normativa N° 03 do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)<sup>118</sup>, a própolis é um produto originado de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas colhidas por abelhas melíferas a partir de brotos, flores e exsudatos de plantas, nas quais acrescentam secreções salivares, enzimas, cera e pólen para elaboração do produto final<sup>118,119,120,121</sup>. Esses componentes hidrolisam os flavonoides

glicosilados em flavonoides agliconas pela ação da  $\beta$ -glicosidase<sup>118,122,123</sup> além de digerirem parcialmente outras substâncias presentes<sup>124</sup>. A própolis pode apresentar coloração e consistência variada<sup>119</sup>.

A palavra própolis é derivada do grego *pro* (em defesa de) e *polis* (cidade), o que significa “em defesa da cidade”, no caso, colmeia. Essa substância é utilizada para proteção contra insetos e microrganismos; reparo de frestas e danos na colmeia; preparo de locais assépticos para postura da abelha rainha; mumificação de insetos invasores quando estes não podem ser removidos, evitando a proliferação de microrganismos patogênicos; como isolante térmico e de compartimentos não utilizados<sup>125,126,127,128</sup>. Ou seja, a própolis é utilizada para isolar tudo que comprometa a sobrevivência da colônia e atua na sua defesa sanitária.

A apicultura no Brasil teve início com o padre Antônio Carneiro que, em 1839, trouxe algumas colônias de abelhas da espécie *Apis mellifera* da região do Porto, em Portugal, para o Rio de Janeiro<sup>129</sup>. Até 1956 a população de abelhas no Brasil era principalmente de origem europeia. Porém, nesse mesmo ano, devido à um escape acidental, no sudeste do Brasil (São Paulo), de abelhas rainhas provenientes de uma pesquisa com vistas a melhorar a produção de mel; houve a introdução de abelhas africanas e o desencadeamento do processo de africanização das abelhas, resultando numa rápida e ampla substituição das abelhas europeias pelas africanizadas<sup>130</sup>. As abelhas mais utilizadas no Brasil para fins comerciais são um híbrido das abelhas europeias (*Apis mellifera mellifera*, *Apis melífera ligustica*, *Apis mellifera caucasica* e *Apis mellifera carnica*) com a abelha africana *Apis mellifera scutellata*<sup>131</sup>. *Apis mellifera mellifera* é a mais abundante, havendo uma predominância das características das abelhas europeias no sul do país, enquanto ao norte predominam características das abelhas africanas<sup>130</sup>. No Brasil, a produção da própolis é realizada principalmente pelas abelhas africanizadas, embora existam própolis produzidas por outras espécies, como as abelhas sem ferrão (*Meliponini*)<sup>132</sup>.

Produtos apícolas têm despertado grande interesse em todas as partes do mundo, não somente pela produção de mel, mas também de própolis, geleia real, cera, pólen e apitoxina<sup>133,134</sup>. A própolis é um dos produtos apícolas que têm alcançado destaque nacional e internacional devido a sua composição química e propriedades biológicas, mas ainda é pouco explorada em algumas regiões<sup>135,136</sup>. No Brasil, a atividade apícola está presente em todos os Estados<sup>137</sup>, sendo que na produção e exportação da própolis destacam-se os Estados de Minas Gerais, São Paulo e Espírito Santo<sup>138</sup>. São produzidas 100 toneladas de própolis de coloração verde no Brasil por ano, sendo que cerca de 90% dessa extração está em Minas Gerais<sup>139</sup>.

Minas Gerais produz anualmente aproximadamente 29 toneladas de própolis, das quais 20 toneladas são de própolis verde, de acordo com a Cooperativa Nacional de Apicultura<sup>140</sup>.

O mercado de própolis movimenta anualmente cerca de 25 milhões de dólares e já alcança um volume de exportação de 70 toneladas, tendo como principais compradores o Japão, Estados Unidos, Alemanha e China<sup>141</sup>. O Brasil responde por 10 a 15% da produção mundial de própolis e atende 80% da demanda japonesa<sup>135,142</sup>. Nos últimos anos, o mercado da própolis vem aumentando. O Brasil tornou-se o terceiro maior produtor mundial, com uma produção estimada em 150 toneladas anuais, realizada por mais de 10 mil produtores, e sendo grande parte destinada à exportação<sup>143,144</sup>. De acordo com estudos recentes, espera-se que até 2021 o mercado mundial de própolis aumente 3,5%, com estimativa de que a produção de 2.300 toneladas no ano de 2015 passe para 2.900 toneladas em 2021<sup>145</sup>.

A própolis brasileira foi classificada por Park et al.<sup>146</sup> em 12 tipos distintos (Quadro 1). Esta classificação foi realizada com base no perfil químico obtido por cromatografia líquida de alta eficiência e na atividade antimicrobiana e antioxidante de cada material analisado.

QUADRO 1 - Classificação da própolis brasileira

<b>Grupos</b>	<b>Cor</b>	<b>Origem geográfica</b>	<b>Substâncias solúveis</b>
Grupo 1 (RS5)	Amarelo	Sul	63,0 %
Grupo 2 (RS1)	Castanho claro	Sul	57,5 %
Grupo 3 (PR7)	Castanho escuro	Sul	65,0 %
Grupo 4 (PR8)	Castanho claro	Sul	54,5 %
Grupo 5 (PR9)	Marrom esverdeado	Sul	58,7 %
Grupo 6 (BA11)	Marrom avermelhado	Nordeste	45,9 %
Grupo 7 (BA51)	Marrom esverdeado	Nordeste	43,8 %
Grupo 8 (PE5)	Castanho escuro	Nordeste	41,3 %
Grupo 9 (PE3)	Amarelo	Nordeste	46,7 %
Grupo 10 (CE3)	Amarelo escuro	Nordeste	24,1 %
Grupo 11 (PI1)	Amarelo	Nordeste	23,1 %
Grupo 12 (SP12)	Verde ou Marrom esverdeado	Sudeste	61,0 %

Legenda: RS-Rio Grande do Sul; PR-Paraná; BA-Bahia; PE-Pernambuco; CE-Ceará; PI-Piauí; SP-São Paulo. Fonte: Adaptado de Park et al. 2000<sup>146</sup>.

Em 2006 foi identificado um novo tipo de própolis, denominada “própolis vermelha”, encontrada em manguezais no litoral da região Nordeste (coletada nos manguezais dos Estados da Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe e Bahia), a qual vem sendo estudada para que seja classificada como grupo 13<sup>147,148</sup>. Ao contrário de outros países, que têm pouca variabilidade na composição química e na origem botânica da própolis, o Brasil tem até o momento 13 grupos diferentes de própolis classificados com base em características físico-químicas, composição de fito-químicos e origem botânica<sup>132,146</sup>. Porém, acredita-se que ainda

haja uma subestimação das variedades de própolis, visto que a flora brasileira apresenta uma imensa diversidade, das quais as abelhas podem coletar<sup>146</sup>.

### 5.1 Origem botânica

Alguns fito-químicos encontrados na própolis estão presentes em todos os tipos, mas outros somente são encontrados em própolis coletadas de determinadas espécies vegetais<sup>149</sup>. Por isso é muito importante elucidar quais são as plantas utilizadas como fonte de resinas na elaboração da própolis. A origem botânica da própolis determina suas variações em composição físico-química. A fonte vegetal utilizada pelas abelhas em países da América do Sul, dentre eles o Brasil, é diferente da encontrada em outros países, tornando a composição química da própolis brasileira diferenciada<sup>119,150</sup>. Devido à ampla diversidade vegetal do Brasil, a correlação do tipo de própolis com a origem botânica é dificultada. Apenas alguns tipos de própolis possuem sua origem botânica identificada<sup>151</sup>.

Park et al.<sup>151</sup> foram os primeiros a descrever os perfis químicos da própolis brasileira e comparar com suas respectivas fontes de plantas. Já foi identificada a origem botânica dos seguintes tipos de própolis: tipo 3 (própolis de álamo) similar quimicamente a *Populus nigra*, família *Salicaceae*; tipo 6 (própolis marrom) similar à árvore *Hyptis divaricate*, tipo 12 (própolis verde) semelhante à árvore *Baccharis dracunculifolia* (alecrim) e tipo 13 (própolis vermelha) semelhante à árvore *Dalbergia ecastophyllum*<sup>132</sup>. No Brasil, há diversas espécies vegetais para a retirada de resina. Porém, poucas foram as espécies identificadas até agora, sendo o assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less.), a aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi) e o eucalipto (*Eucalyptus* spp.) outros exemplos de vegetais onde as abelhas buscam a matéria-prima para a produção da própolis<sup>146</sup>.

Nos países da Europa, América do Norte e oeste da Ásia encontra-se como principal fonte vegetal para a própolis o choupos (*Populus* sp), espécie que não é nativa em países tropicais como o Brasil<sup>152</sup>. Mesmo não sendo nativa, esta espécie já foi identificada como a principal fonte vegetal em pesquisas com amostras de própolis marrom de regiões Sul do Brasil, Venezuela, Argentina e Uruguai. A justificativa ocorre porque a *Populus alba* pode ser encontrada em regiões de clima ameno, e as abelhas acabam preferindo este tipo de resina, o que pode ser atribuída as características genéticas de cada espécie de abelha<sup>151</sup>. No entanto, estudos da composição das resinas utilizadas pelas abelhas na Venezuela e no Brasil demonstraram uma composição química diferenciada, por não apresentarem os flavonoides presentes na choupos<sup>150,153</sup>.

## 5.2 Composição química

A composição majoritária da própolis bruta é constituída de resina de vegetais (aproximadamente 60%) e na sua fração minoritária encontram-se cera de abelha (30%), óleos essenciais, vitaminas e microelementos (10%), pólen (5%) e detritos (5%)<sup>120,122,154</sup>. De acordo com Chen et al.<sup>155</sup>, a própolis possui uma composição química bem heterogênea e complexa, sendo possível encontrar os diversos grupos químicos, desde aminoácidos até micro e macrominerais. A própolis possui mais de 420 substâncias identificadas, incluindo compostos fenólicos (flavonoides), considerados seus principais compostos bioativos e responsáveis pela maior parte dos efeitos biológicos atribuídos a esta substância<sup>156,157,158,159</sup>.

Diversos fatores externos proporcionam alterações nas características físicas, químicas e sensoriais da própolis, influenciando diretamente nas suas propriedades químicas e biológicas. Os principais agentes causadores desta variação são: características fitogeográficas existentes ao redor da colmeia<sup>160</sup>; sazonalidade<sup>161</sup>; época da colheita e técnica utilizada; gênero e espécie de abelha que a produziu<sup>119,123,148,162,163</sup>. De maneira geral, os principais compostos bioativos presentes na própolis são os compostos fenólicos (flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres), terpenoides e esteroides<sup>155,164</sup>. Além destes, também são encontrados compostos voláteis, os quais são os responsáveis pelo sabor e odor característico da própolis. Dentre as classes de compostos voláteis identificadas em amostras de própolis, os em maior proporção são ácidos (ácido benzóico e seus ésteres), álcoois, ésteres, aldeídos, terpenos e hidrocarbonetos (olefinas e aromáticos)<sup>164</sup>. Açúcares, proteínas, aminoácidos, vitaminas A, B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub>, C e E e minerais, como Mn, Cu, Ca, Al, V, Ni, Zn e Cr também podem compor a própolis<sup>165</sup>.

## 5.3 Utilização para fins terapêuticos

A própolis vem sendo utilizada desde as civilizações antigas para diversas finalidades. Os egípcios a utilizavam para embalsamar os mortos, os gregos na cicatrização de ferimentos e os romanos para amenizar dores e diminuir inchaços<sup>135,166</sup>. Atualmente tem grande importância para uso veterinário no tratamento de mastite bovina e cicatrização de cortes; na agricultura no combate a doenças pós-colheita dos frutos; na produção de cosméticos vem sendo utilizada em cremes, xampu e sabonetes; na indústria de alimentos aplicada em bebidas, alimentos saudáveis e suplementos nutricionais; e na indústria

farmacêutica na forma de xaropes, pastilhas, cápsulas e extratos<sup>167,168</sup> para o tratamento de diversas doenças como alergias, diabetes, infecções, dermatites, queimaduras e problemas gástricos ou hepáticos; devido as suas propriedades biológicas e terapêuticas<sup>163,169,170,171,172,173</sup>.

O seu uso popular despertou o interesse de pesquisas científicas que revelaram ser uma fonte potencial de diversas substâncias bioativas<sup>157,171</sup>. Os benefícios atribuídos ao seu uso e de seus produtos têm sido considerados devido à presença de alguns compostos isolados e ao sinergismo entre eles<sup>119,170</sup>. No Brasil o interesse pela própolis surgiu na década de 80 com um estudo pioneiro de Ernesto Ulrich Breyer com o livro “Abelhas e saúde”, demonstrando as propriedades terapêuticas da própolis e sua utilização como antibiótico natural<sup>152</sup>.

Muitas características biológicas da própolis têm sido estudadas e têm mostrado resultados positivos de ação antimicrobiana<sup>150,153,174,175</sup>, antifúngica<sup>152,176</sup>, antiparasitária<sup>177</sup>, antiviral<sup>178</sup>, anti-inflamatória<sup>133,150</sup>, antitumoral<sup>148,179</sup>, cicatrizante<sup>180</sup>, anestésica<sup>120</sup>, antioxidante<sup>134,170</sup>, imunomoduladora<sup>181,182</sup>, anti-hipertensiva<sup>183,184</sup>, redutora dos níveis de colesterol<sup>185</sup>, ansiolítica e antidepressiva<sup>186</sup>, entre outras que são atribuídas à sua complexa composição química, principalmente pela presença de fito-químicos oriundos do metabolismo secundário das plantas<sup>124,132,216</sup>. Sendo assim, avaliar o potencial antimicrobiano de extratos etanólicos de própolis verde e vermelha *in vitro* frente a isolados de *Salmonella* provenientes de produtos avícolas é importante no que tange a busca por métodos alternativos de tratamento e controle do patógeno.

## REFERÊNCIAS

1. Schultz M. Theobald Smith. *Emerging Infect Dis.* 2008;14(12):1940-2.
2. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de pesquisa em vigilância sanitária de alimentos. Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. Programa nacional de monitoramento da prevalência e da resistência bacteriana em frango - PREBAF. Brasília; 2012. 171p.
3. Gast RK. Chapter 16: *Salmonella* infections. In: Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW. *Diseases of Poultry*, 11a ed. Ames: Iowa University Press; 2003. p. 567-613.
4. Center for Disease, Control and Prevention. *Salmonella*, 2019. [acesso 04 jul 2019]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/salmonella/general/index.html>.
5. Germano PML, Germano MIS. Agentes Bacterianos de Toxinfeções. In: Germano PML, Germano MIS. *Higiene e Vigilância Sanitária de Alimentos*. 3ª ed. São Paulo: Manole; 2008. p.277-356.
6. Le Minor L. *Salmonella*. In: Le Minor L, Veron M *Bactériologie médicale*. France: Flammarion Médecine-Sciences; 1982, p. 259-74.
7. Popoff MY, Le Minor LE. The genus *Salmonella*. In: Brenner DJ, Krieg NR, Staley JT, editors. *Bergey's manual of systematic bacteriology*. 2nd ed. Vol. 2. New York USA: Springer; 2005. p.764-99.
8. Arrach N, Porwollik S, Cheng P, Cho A, Long F, Choi SH, McClelland M. *Salmonella* Serovar Identification Using PCR-Based Detection of Gene Presence and Absence. *J Clin Microbiol.* 2008;46(8):2581-9.
9. Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol.* 2014;165(7):526-30.
10. Crosa JH, Brenner DJ, Ewing WH, Falkow S. Molecular relationships among the salmonellae. *J Bacteriol.* 1973;115:307-15.
11. Le Minor L, Popoff MY. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int J Syst Bacteriol.* 1987;37(4):465-8.
12. Reeves MW, Evins GM, Heiba AA, Plikaytis BD, Farmer JJ 3rd. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J Clin Microbiol* 1989;27(2):313-20.
13. Ray, B. *Fundamental Food Microbiology*. USA: CRC press; 2004. 608p.
14. Popoff MY, Le Minor L. Antigenic formulas of the *Salmonella* serovars. In: World Health Organization Collaborating Centre for Reference and Research on *Salmonella*. 7th ed. França: Instituto Pasteur; 1997. 151p.
15. Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. *Salmonella* Nomenclature. *J Clin Microbiol.* 2000;38(7):2465-7.
16. Su LH, Chiu CH. *Salmonella*: Clinical importance and evolution of nomenclature. *Chang Gung Med J.* 2007;30(3):210-9.
17. Shelobolina ES, Sullivan SA, O'Neill KR, Nevin KP, Lovley DR. Isolation, Characterization, and U(VI)-Reducing Potential of a Facultatively Anaerobic, Acid-Resistant Bacterium from Low-pH, Nitrate- and U(VI)-Contaminated Subsurface Sediment and Description of *Salmonella subterranea* sp. nov. *Appl Environ Microbiol.* 2004;70(5):2959-65.

18. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont PAD, Weill FX. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. *Res Microbiol.* 2010;161(1):26-9.
19. Terzolo HR. Estudio bacteriológico de las salmonelosis de las aves (*S. pullorum*, *S. gallinarum*, *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium*) em La América Latina. Simpósio Internacional sobre Salmonelose Aviária, 2011. Rio de Janeiro, Brasil.
20. Foley SL, Johnson TJ, Ricke SC, Nayak R, Danzeisen J. *Salmonella* Pathogenicity and Host Adaptation in Chicken-Associated Serovars. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2013;77(4):582-607.
21. Shinohara NKS, Barros VB, Jimenez SMC, Machado ECL, Dutra RAF, Filho JLL. *Salmonella* spp. importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Cien Saude Colet.* 2008;13(5):1675-83.
22. International Commission on Microbiological Specifications for Foods. *Microorganisms in Foods 5: Microbiological Specifications of Food Pathogens.* London: Blackie Academic and Professional, 1996. 514 p.
23. D'aoust JY, Maures J. *Salmonella* species. In: Doyle MP, Beuchat LR, editors. *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers.* Washington: ASM Press, 2007.
24. Yan SS, Pendrak ML, Abeka-Ridder B, Punderson JW, Fedorko DP, Foley SL. An overview of *Salmonella* typing: public health perspectives. *Clinical and Applied Immunol Rev.* 2003;4:189-204.
25. Pui CF, Wong WC, Chai LC, Tunung R, Jeyaletchumi P, Hidayah MS, Ubong A, Farinazleen MG, Cheah YK, Son R. *Salmonella*: a foodborne pathogen. *Inter Food Res J.* 2011;18:465-73.
26. Le Minor L. Genus III. *Salmonella* Lignières 1900. In: Krieg NR, Holt JG, editors. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology.* Baltimore: Williams & Wilkins Co;1984. p. 427-58.
27. Franco BDGDM, Landgraf M. *Microbiologia dos Alimentos.* São Paulo: Atheneu, 2002. 182p.
28. Quinn PJ, Markey BK, Carter ME, Donnelly WJC, Leonard FC. *Microbiologia veterinária e doenças infecciosas.* São Paulo: Artmed, 2005. 512 p.
29. Holt JG, Krieg NR, Sneath PH, Staley JT, Stanley TW. *Bergey's manual of determinative bacteriology.* 9 ed. Baltimore: Lippincott Williams & Wilkins, 1994. 787 p.
30. Gast RK. Chapter 16: *Salmonella* infections - Paratyphoid Infections. In: Saif YM. *Disease of Poultry*, 12a ed. Iowa: Blackwell Publishing; 2008. p. 635-65.
31. Berndt A, Wilhelm A, Jugert C, Pieper J, Sacke K, Methner U. Chicken cecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. *Infect Immun.* 2007;75(12):5993-6007.
32. Wilson RL, Elton J, Clegg S, Jones BD. *Salmonella enterica* serovars Gallinarum and Pullorum expressing *Salmonella enterica* serovar Typhimurium Type 1 fimbriae exhibit increased invasiveness for mammalian cells. *Infect Immun.* 2000;68(8):4782-5.
33. Sánchez-Vargas FM, Abu-El-Haija MA, Gómez-Duarte OG. *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention. *Travel Med Infect Dis.* 2011;9(6):263-77.
34. Scallan E, Hoekstra RM, Angulo FJ, Tauxe RV, Widdowson M, Roy SL, Jones JL, Griffin PM. Foodborne illness acquired in the United States - Major pathogens. *Emerg Infect Dis.* 2011;17(1):7-15.
35. Altekruse SF, Cohen ML, Swerdlow DL. Emerging foodborne diseases. *Emerg Infect Dis* 1997;3(3):285-93.

36. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresee JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food-related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis* 1999;5:607-25.
37. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos-VE-DTA. São Paulo, SP. 2014. [acesso 07 jul 2019] Disponível em: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/270383/mod\\_resource/content/1/Vigil%C3%A2ncia%20Epidemiol%C3%B3gica%20das%20Doen%C3%A7as%20Transmitidas%20por%20Alimentos%20E2%80%93VE-DTA.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/270383/mod_resource/content/1/Vigil%C3%A2ncia%20Epidemiol%C3%B3gica%20das%20Doen%C3%A7as%20Transmitidas%20por%20Alimentos%20E2%80%93VE-DTA.pdf)
38. Center for Disease, Control and Prevention. Preliminary FoodNet data on the incidence of infection with pathogens transmitted commonly through food-10 states, 2008. *Morb Mortal Wkly Rep*. 2009;58:333-7.
39. Food and Agriculture Organization. World Health Organization. Microbiological Risk Assessment Series, 19. *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat: meeting report. Rome: FAO, 2009. 66p.
40. Jokinen CC, Schreier H, Mauro W, Taboada E, Isaac-Renton JL, Topp E, Edge T, Thomas JE, Gannon VP. The occurrence and sources of *Campylobacter* spp., *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157:H7 in the Salmon River, British Columbia, Canada. *J Water Health*. 2010;8(2):374-86.
41. Hendriksen RS, Vieira AR, Karlsmose S, Lo Fo Wong DM, Jensen AB, Wegener HC, Aarestrup FM. Global monitoring of *Salmonella* serovar distribution from the World Health Organization Global Foodborne Infections Network Country Data Bank: results of quality assured laboratories from 2001 to 2007. *Foodborne Pathog Dis*. 2011;8(8):887-900.
42. Murray P, Rosenthal K, Pfaller M. Microbiologia médica, 5a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2006. 255 p.
43. Rodrigues DP, Theophilo, GND, Reis EMF, Lázaro NS. Manual técnico. Doenças de transmissão alimentar: aspectos clínicos, coleta e transporte de material. Atualização técnico-científico. 2008.
44. Malorny B, Huehn S, Dieckmann R, Krämer N, Helmuth R. Polymerase Chain Reaction for the Rapid Detection and Serovar Identification of *Salmonella* in Food and Feeding Stuff. *Food Anal Methods*. 2009;2:81-95.
45. Ekperigin HE, Nagaraja KV. *Salmonella*. *Microb Food Borne Pathog*. 1998;14:17-29.
46. Cardoso M. Doenças transmitidas por alimentos de origem suína. Simpósio UFRGS sobre manejo, reprodução e sanidade suína, 2006, Porto Alegre. Anais. Porto Alegre: UFRGS, 2006. p. 92-103.
47. Kumar Y, Sharma A, Sehgal R, Kumar S. Distribution trends of *Salmonella* serovars in India (2001–2005). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2009;103(4):390-4.
48. World Health Organization. *Salmonella*. 2015. [acesso 17 jul 2019] Disponível em: <http://www.who.int/topics/salmonella/en/>.
49. Oliveira, LG. Infecção experimental por *Salmonella* entérica subespécie enterica sorotipo Panama e tentativa de transmissão nasonasal em leitões desmamados. [Dissertação]. Jaboticabal: Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias; 2008. 56 p.
50. Brasil. Ministério da Saúde. Doenças transmitidas por alimentos. MS, São Paulo, 2015. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/09/Apresenta----o-dados-gerais-DTA-2015.pdf>
51. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota técnica. Entenda melhor - *Salmonella* em carne de frango. 2018. Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/entenda-melhor-salmonela-em-carne-de-frango/@@download/file/Nota%20t%C3%A9cnica%20Salmonella%20CRISC%2012.03.2018.pdf>

52. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Coordenação Geral de Doenças Transmissíveis. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil - Informe 2018. Boletim eletrônico epidemiológico, Brasília, DF, 2019.
53. Gantois I, Ducatelle R, Pasmans F, Haesebrouk F, Gast R, Humprey TJ, Van Immerseel F. Mechanisms of egg contamination by *Salmonella* Enteritidis. FEMS Microbiol Rev. 2009;33(4):718-38.
54. Kabir SML. Avian Colibacillosis and Salmonellosis: A Closer Look at Epidemiology, Pathogenesis, Diagnosis, Control and Public Health Concerns. Inter J Environ Res Public Health. 2010;7(1):89-114.
55. Hafez HM. Governmental regulations and concept behind eradication and control of some important poultry diseases - Reviews. World's Poultry Sci J. 2005;61(4):569-82.
56. Afshin J, Saeid S, Reza G. Study on *Salmonella* contamination in poultry lean meat and meat with skin in Tabriz slaughter houses. Afr J Biotech. 2014;13(1):181-184.
57. Hofer E, Filho SJS, Reis EMF. Prevalência de sorovares de *Salmonella* isolados de aves no Brasil. Pesq Vet Bras. 1997;17(2):52-62.
58. Calixto ERA, Serafini AB, Kipnis A, André MCDPB. Prevalência de *Salmonella* e ocorrência de cepas resistentes a antimicrobianos, em insumos de rações para aves produzidos por um matadouro-frigorífico com fiscalização permanente, em Goiânia, GO. Rev Hig Al. 2002;16(101):56-61.
59. Cardoso ALSP, Tessari ENC. *Salmonella* na segurança dos alimentos. Biológico. 2008;70(1):11-3.
60. Tu LTP, Hoang NVM, Cuong NV, Campbell J, Brant JE, Hoa NT, Kiet BT, Thompson C, Duyy DT, Phhat VV, Hien VB, Twaites G, Baker S, Carrique-Mas JJ. High levels of contamination and antimicrobial-resistant non-typhoidal *Salmonella* serovars on pig and poultry farms in the Mekong Delta of Vietnam. Epidemiol Infect. 2015;143(14):3074-86.
61. Suresh T, Hatha AAM, Harsha HT, Lakshmanaperumalsamy P. Prevalence and distribution of *Salmonella* serotypes in marketed broiler chickens and processing environment in Coimbatore City of southern India. Food Res Internat. 2011;44(3):823-5.
62. Marin C, Balasch S, Veja S, Lainez M. Sources of *Salmonella* contamination during broiler production in Eastern Spain. Prev Vet Med. 2011;98(1):39-45.
63. Holt PS, Geden CJ, Moore RW, Gast RK. Isolation of *Salmonella* enterica serovar Enteritidis from houseflies (*Musca domestica*) found in rooms containing *Salmonella* serovar Enteritidis challenged hens. Appl Environ Microbiol. 2007;73(19):6030-35.
64. Chernaki-Leffer AM, Biesdorf SM, Almeida LM, Leffer EVB, Vigne F. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no oeste do estado do Paraná, Brasil. Rev Bras Ciên Avícola. 2002;4(3):243-7.
65. Moro CV, De Luna CJ, Tod A, Guy JH, Sparagano OAE, Zenner L. The poultry red mite (*Dermanyssus gallinae*): a potential vector of pathogenic agents. Exp App Acarol. 2009;48(1-2):93-104.
66. Hernandez J, Bonnedahl J, Waldenström J, Palmgren H, Olsen B. *Salmonella* in birds migrating through Sweden. Emerg Infect Dis. 2003;9(6):753-5.
67. Tsiodras S, Kelesidis T, Kelesidis I, Bauchinger U, Falagas ME. Human infections associated with wild birds. J Infect. 2008;56(2):83-98.

68. Sousa E, Werther K, Berchieri Jr A. Assessment of Newcastle and infectious bronchitis pathogens, and *Salmonella* spp. in wild birds captured near poultry facilities. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2010;62(1):219-23.
69. Perdoncini G, da Rocha DT, Moraes C da R, Borsoi A, Schmidt V. Presença de *Salmonella* spp. em pintos de um dia, comercializados para produção não industrial em Santa Catarina. *Acta Sci Vet.* 2011;39(1):1-3.
70. Carrasco L, Morales-Rueda A, García-Gimeno RM. Cross-contamination and recontamination by *Salmonella* in foods: A review. *Food Res Inter.* 2011;45(2012):545-56.
71. Ono K, Yamamoto K. Contamination of meat with *Campylobacter jejuni* in Saitama, Japan. *Int J Food Microbiol.* 1999;47:211-219.
72. Bersot LS. *Salmonella* no Brasil: Sua importância no abate das aves. Simpósio de Sanidade Avícola da UFSM, 2006, Santa Maria. Anais. Santa Maria: UFSM, 2006. p. 90-94.
73. Alcântara JB. Pesquisa de *Salmonella* sp. em aves criadas em sistema industrial e alternativo. [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2015. 72p.
74. Özbey G, Seven PT, Muz A, Ertaş HB, Çerçi IH. Isolation of *Salmonella* spp. from faecal samples of cracked egg fed hens and Polymerase Chain Reaction (PCR) confirmation. *Bulg J Vet Med.* 2008;11(2):103-12.
75. Salle CTP, Moraes HLS. Prevenção de doenças / Manejo profilático / Monitoria. In: Berchieri Jr A, Silva EM, Fábio J, Sesti L, Zuanaze MAF. Doenças das aves. 2ed. Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2009. p.1-50.
76. European Food Safety Authority. EFSA explains zoonotic diseases: *Salmonella*. 2014. [acesso 08 jul 2019] Disponível em: [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/factsheetsalmonella.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetsalmonella.pdf).
77. Moreira GN, Rezende CSM, Carvalho RN, Mesquita SQP, Oliveira NA, Arruda MLT. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. *Rev Inst Adolf Lutz.* 2008;62(2):126-30.
78. Walsh C. Antibiotics: Actions, Origins, Resistance. ASM Press: Washington, 2003. 335p.
79. Mehdi Y, Létourneau-Montminy MP, Gaucher ML, Chorfi Y, Suresh G, Rouissi T, Brar SK, Côté C, Ramirez AA, Godbout S. Use of antibiotics in broiler production: Global impacts and alternatives. *Anim Nutr.* 2018;4(2):170-8.
80. Zarb P, Goossens H. Human use of antimicrobial agents. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2012;31(1):121-3.
81. Organização Mundial da Saúde. Critically important antimicrobials for human medicine. 5ª Ed. Genebra: WHO. 2017, 48 p.
82. Acar JF, Moulin G, Page SW, Pastoret PP. Antimicrobial resistance in animal and public health: introduction and classification of antimicrobial agents. *Rev Sci Tech Off Int Epiz.* 2012;31(1):15-21.
83. Van Boeckel TP, Brower C, Gilbert M, Grenfell BT, Levin SA, Robinson TP, Teillant A, Laxminarayan R. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;112(18):5649-54.
84. Butaye P, Van Duijkeren E, Prescott JF, Schwarz S. Antimicrobial resistance in bacteria from animals and the environment. *Vet Microbiol.* 2014;171:269-72.
85. Guardabassi L, Prescott JF. Antimicrobial stewardship in small animal veterinary practice: from theory to practice. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 2015;45(2):361-76.

86. Greeson K, Suliman GM, Sami A, Alowaimer A, Koohmaraie M. Frequency of antibiotic resistant *Salmonella*, *Escherichia coli*, *Enterococcus*, and *Staphylococcus aureus* in meat in Saudi Arabia. *African Journal of Microbiology*. Afr J Microbiol Res. 2013;7(4):309-316.
87. Mendonça EP. Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil. [Tese] Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária. 2016. 131 p.
88. Balsalobre LC, Dropa M, Matté MH. An overview of antimicrobial resistance and its public health significance. *Braz J Microbiol*. 2014;45(1):1-5.
89. Jajaa IF, Bhembeb NL, Greenc E, Oguttud J, Muchenje V. Molecular characterisation of antibiotic-resistant *Salmonella enterica* isolates recovered from meat in South Africa. *Acta Trop*. 2019;190:129-36.
90. Centers for Disease Control and prevention (CDC). About Antimicrobial Resistance. [acesso 28 out 2019]. Disponível em: <https://www.cdc.gov/drugresistance/about.html>
91. O'neill J. Tackling drug-resistant infections globally: final report and recommendations, The review on antimicrobial resistance. AMR, may 2016. 80p.
92. Kempf I, Zeitouni S. Coût biologique De La résistance aux antibiotiques: analyse et conséquences. *Pathol Biol*, 2012;60(2):e9-e14.
93. Tenover FC. Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *Am J Med*. 2006;119(6 Suppl 1):S3-10.
94. Gelinski JMLN, Bombassaro A, Baratto CM, Vicente VA. Resistance to Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamases in *Salmonella* from a Broiler Supply Chain. *Int J Environ Res Public Health*. 2014;11(11):11718-26.
95. Salois MJ, Baker K, Watkins K. The impact of antibiotic-free production on broiler chicken health: an econometric analysis. Annual Meeting, February 6-9, 2016, San Antonio, Texas.
96. Pandini JA, Pinto FGS, Muller JM, Weber LD, Moura AC. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. *Arq Inst Biol*. 2014;82:1-6.
97. Food and Drug Administration - FDA. 2016 summary report on antimicrobials sold or distributed for use in food-producing animals. Maryland: FDA: Department of Health and Human Services; 2017. p 67.
98. Koluman A, Dikici A. Antimicrobial resistance of emerging foodborne pathogens: status quo and global trends. *Crit Rev Microbiol*. 2013;39(1):57-69.
99. Pulido-Landínez M, Washington P, Thornton JK, Zhang Y, Sánchez-Ingunza R, Banda A, Guard J, Nascimento VP, Magee DL, Mauel MJ. Serotype and antimicrobial resistance patterns of *Salmonella* isolates from commercial birds and poultry environment in Mississippi. *Avian Dis*. 2014;58(1):64-70.
100. Proroga YTR, Capuano F, Carullo MR, La Tela I, Capparelli R, Barco L, Pasquale V. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains from food of animal origin in Southern Italy. *Folia Microbiol*. 2016;61(1):21-7.
101. European Food Safety Authority - EFSA. EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA J*. 2017;15:1-270.
102. Lai J, Wu C, Wu C, Qi J, Wang Y, Wang H, Liu Y, Shen J. Serotype distribution and antibiotic resistance of *Salmonella* in food-producing animals in Shandong province of China, 2009 and 2012. *Int J Food Microbiol*. 2014;16(180):30-8.
103. Voss-Rech D, Potter L, Vaz CSL, Pereira DIB, Sangioni LA, Vargas AC, Botton SA. Antimicrobial Resistance in Nontyphoidal *Salmonella* Isolated from Human and

- Poultry-Related Samples in Brazil: 20-Year Meta-Analysis. *Foodborne Pathog Dis.* 2017;14(2):116-24.
104. Hohmann EL. Nontyphoidal salmonellosis. *Clin Infect Dis.* 2001;32(2):263-9.
  105. Fàbrega A, Vila J. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium skills to succeed in the host: virulence and regulation. *Clin Microbiol Rev.* 2013;26(2):308-41.
  106. Campioni F, Souza RA, Martins VV, Stehling EG, Bergamini AMM, Falcão JP. Prevalence of *gyrA* Mutations in Nalidixic Acid-Resistant Strains of *Salmonella* Enteritidis Isolated from Humans, Food, Chickens, and the Farm Environment in Brazil. *Microb Drug Resist.* 2017; 23(4):421-8.
  107. Helms M, Vastrup P, Gerner-Smidt P, Mølbak K. Excess mortality associated with antimicrobial drug resistant *Salmonella typhimurium*. *Emerg Infect Dis.* 2002;8(5):490-5.
  108. World Organization for Animal Health - OIE 2015. List of antimicrobial agentes of veterinary importance. [acesso em 28 out 2019]. Disponível em: [http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our\\_scientific\\_expertise/docs/pdf/Eng\\_OIE\\_List\\_antimicrobials\\_May2015.pdf](http://www.oie.int/fileadmin/Home/eng/Our_scientific_expertise/docs/pdf/Eng_OIE_List_antimicrobials_May2015.pdf).
  109. World Health Organization - WHO *Salmonella* (non-typhoidal). Factsheet 139. 2016. [acesso em 28 out 2019]. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>.
  110. Van Asten AJAM, Van Dijk JE. Distribution of "classic" virulence factors among *Salmonella* spp. *Fems Immunol Med Microbiol.* 2005;44(3):251-9.
  111. Suzuki S. Pathogenicity of *Salmonella* Enteritidis in poultry. *Inter J Microbiol.* 1994;21:89-105.
  112. Ferreira EO, Campos LC. *Salmonella*. In: Trabulsi LR, Alterthum F. *Microbiologia.* 5 ed. São Paulo: Atheneu, p. 329-338. 2008.
  113. Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clinic Microbiol Rev.* 2004;19(1):14-56.
  114. Berchieri Júnior A, Freitas Neto OC. Salmoneloses. In: Berchieri Júnior et al. *Doenças das aves.* Campinas: Fundação APINCO de Ciência e Tecnologia Avícolas, p. 435-54. 2ed. 2009.
  115. Elemfareji OI, Thong KL. Comparative virulotyping of *Salmonella typhi* and *Salmonella enteritidis*. *Indian J Microbiol;* 2013;53:410-7.
  116. Silva AC, Iacuzio R, Cândido TJS, Rodrigues MX, Cirone NC. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isolados de carcaças de frangos: resistência a antibióticos e óleos essenciais. *Rev Bras Agro Sus.* 2018;8(1):95-103.
  117. Gebreyes WA, Wittum T, Habing GW, Alali W, Suzuki S. Chapter 4 - Spread of Antibiotic Resistance in Food Animal Production Systems. In: Dodd CER, Aldsworth T, Stein RA, Cliver DO, Riemann HP. (Eds). *Foodborne Diseases (Third edition).* Cambridge: Academic Press, 2017. p.105-130.
  118. Bankova V, Popova M, Trusheva B. Propolis volatile compounds: chemical diversity and biological activity: a review. *Chem Cent J.* 2014;8:28:1-8.
  119. Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie.* 2000;31(1):3-15.
  120. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie.* 1995;26:83-9.
  121. Souza JP, Furtado NAJC, Jorge R, Soares AEE, Bastos JK. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Rev Bras Farmacognosia.* 2007;17(1):85-93.
  122. Ghisalberti EL. Propolis: A Review. *Bee World.* 1979, 60:2,59-84.

123. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem Toxicol.* 1998;36(4):347-363.
124. Shang-Jung Y, Jia-Jiuan W, Yuan-Chuen W, Chih-Feng H, Tzongming W, Chwen-Jen, S, Chieh-Ming JC. Encapsulation of propolis flavonoids in a water soluble polymer using pressurized carbon dioxide anti-solvent crystallization. *J Supercritical Fluids.* 2014;94:138-146.
125. Bardana GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food and Chemical Toxicology.* 1998;36(4):341-63.
126. Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and Chemical Variation of Brazilian Propolis. *Evid Bas Complement Alter Med.* 2005;2(1):33-8.
127. Neto MSR, Tintino SR, Da Silva ARP, Costa M Do S, Boligon AA, Matias EF, Balbino V De Q, Menezes IRA, Coutinho HDM. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. *Food Chem Toxicol.* 2017;107(B):572-80.
128. Costa PSC, Oliveira JS. *Manual Prático de Criação de Abelhas.* 2a ed. Viçosa: Editora Aprenda Fácil, 2018. 424p.
129. Souza DC. *Apicultura - manual do agente de desenvolvimento rural.* 2. ed. Brasília: Sebrae, 2007. 186p.
130. Koo MH, Park YK. Investigation of flavonoid aglycones in propolis collected by two different varieties of bees in the same region. *Bios Biotechnol Bioch.* 1997;61:367-9.
131. Camargo RCR, Pereira FM, Lopes MTR. *Produção de mel.* Embrapa Meio-norte. 1a edição. 2002. 138p.
132. Franchin M, Freires IA, Lazarini JG, Nani BD, Da Cunha MG, Colón DF, Rosalen PL. The use of Brazilian propolis for discovery and development of novel anti-inflammatory drugs. *Eur J Med Chemistry.* 2018;153:49-55.
133. Silva JC, Rodrigues S, Feás X, Estevinho LM. Antimicrobial activity, phenolic profile and role in the inflammation of propolis. *Food Chem Toxicol.* 2012;50(5):1790-5.
134. Lopes MA. *Qualidade dos Produtos Apícolas da Guiné Bissau: Mel e Própolis.* [Dissertação] Bragança: Universidade de Salamanca, Instituto Politécnico de Bragança, 2014. 91p.
135. Pereira A dos S, Seixas FRMS, Neto FR de A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova.* 2002;25(2):321-6.
136. Silva RPD, Machado BAS, Barreto GA, Costa SS, Andrade LN, Amaral RG, Carvalho AA, Padilha FF, Barbosa JD, Umsza-Guez MA. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS One.* 2017;12(3):1-18.
137. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2017. Pesquisa Pecuária Municipal. Sistema IBGE de Recuperação Automática (SIDRA) [acesso 10 jul 2019] Disponível em: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/6622>.
138. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Técnicas de manejo para produção do pólen. 2015. [acesso 10 jul 2019] Disponível em: <http://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/tecnicas-de-manejo-para-producao-do-polen,3f58fa2da4c72410VgnVCM100000b272010aRCRD>.
139. Cooperativa Nacional de Apicultura. Crise econômica faz crescer o uso da própolis verde. 2016. [acesso 10 jul 2019] Disponível em: <http://www.conap.coop.br/2016/05/05/crise-economica-faz-crescer-o-uso-da-propolis-verde/>.
140. Cooperativa Nacional de Apicultura. Própolis verde está em alta por ser um antibiótico natural. 2018. [acesso 10 jul 2019] Disponível em:

<http://www.melsantabarbara.com.br/propolis-verde-esta-em-alta-por-ser-um-antibiotico-natural/>.

141. Albuquerque IL. Estudo dos constituintes químicos de duas amostras de própolis: Alto Santo - Ceará e Passo Quatro - Minas Gerais. [Tese]. Fortaleza: Universidade do Ceará, Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, 2007. 173 p.
142. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. Própolis: alternativa para diversificar a produção apícola. Relatório de Inteligência 2013. [acesso 10 jul 2019] Disponível em: <https://atendimento.sebrae-sc.com.br/inteligencia/relatorio-de-inteligencia/propolis-alternativa-para-diversificar-a-producao-apicola>.
143. Brighenti DM, Santos FC, Brighenti CRG. Método para intensificar a produção de própolis: o quadro coletor "tira e põe". Mensagem Doce. 2006; 85. [acesso 10 jul 2019] Disponível em: <http://apacame.org.br/mensagemdoce/85/artigo.htm>.
144. Pereira DS, Freitas CIA, Freitas MO, Maracajá PB, Silva JB da, Silva RA da, Silveira DC da. Histórico e principais usos da própolis apícola. 2015;11(2):01-21.
145. De Francisco L, Pinto D, Rosseto H, Toledo L, Santos R, Tobaldini-Valério F, Svidzinski T, Bruschi M, Sarmiento B, Oliveira MBPP, Rodrigues F. Evaluation of radical scavenging activity, intestinal cell viability and antifungal activity of Brazilian propolis by-product. *Food Res Int.* 2018;105:537-47.
146. Park YK, Ikegaki M, Alencar SM, Moura FF. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. *Honeybee Sci.* 2000;21(2):85-90.
147. Dausch A, Moraes CS, Fort P, Pacheco E, Lima I.B, Abreu JA, Park YK. Própolis Vermelha e sua origem botânica. Mensagem Doce. 2006;89. [acesso 10 jul 2019] Disponível em: <http://apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo.htm>.
148. Frozza COS, Garcia CSC, Gambato G, de Souza MDO, Salvador M, Moura S, Padilha FF, Seixas FK, Collares T, Borsuk S, Dellagostin OA, Henriques JAP, Roesch-Ely M. Chemical characterization, antioxidante and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food Chem Toxicol.* 2013;52:137-42.
149. Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Costa MM, Silva MS, Viana LR. Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcoólico de própolis. *Ciênc Rur.* 2004;34(1):159-63.
150. Marcucci MC, Ferreres F, García-Viguera C, Bankova VS, De Castro SL, Dantas AP, Valente PH, Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. *J Ethnopharmacol.* 2001;74(2):105-12.
151. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agr Food Chem.* 2002;50(9):2502-6.
152. Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Neto JR. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Braz J Pharmaco.* 2008;18(3):447-54.
153. Ishida VF de C, Negri G, Salatino AS, Bandeira MFCL. A new type of Brazilian propolis: Prenylated benzophenones in propolis from Amazon and effects against cariogenic bacteria. *Food Chem.* 2011;125(3):966-72.
154. Dos Reis AS, Diedrich C, Moura C De, Pereira D, Almeida J De F, Da Silva LD, Plata-Oviedo MSV, Tavaresa RAW, Carpes ST. Physico-chemical characteristics of microencapsulated propolis co-product extract and its effect on storage stability of burger meat during storage at 15 °C. *LWT - Food Sci Technol.* 2017;76(B):306-13.
155. Chen CN, Wu CL, Shy HS, Lin JK. Cytotoxic Prenylflavanones from Taiwanese Propolis. *J Nat Prod.* 2003;66(4):503-6.
156. Dausch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian red propolis chemical composition and botanical origin. *Evid Bas Complement Alternat Med.* 2008;5(4):435-41.
157. Cottica SM, Sawaya ACHF, Eberlin MN, Franco SL, Zeoula LM, Visentainer JV. Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by Different Methods of Extraction. *J Braz Chem Soc.* 2011;22(5):929-35.

158. De Souza GG, Pfenning LH, De Moura F, Salgado M, Takahashi JA. Isolation, identification and antimicrobial activity of propolis-associated fungi. *Nat Prod Res.* 2013;27(18):1705-7.
159. Ristivojević P, Dimkić I, Trifković J, Berić T, Vovk I, Milojković-Opsenica D, Stanković S. Antimicrobial Activity of Serbian Propolis Evaluated by Means of MIC, HPTLC, Bioautography and Chemometrics. *PLoS One.* 2016;11(6):1-15.
160. Kumazawa S, Hamassaka T, Nakayama T. Antioxidant activity of propolis of various geographic origins. *Food Chem.* 2004;84(3):329-39.
161. Sforcin JM, Fernades A Jr, Lopes CAM, Bankova V, Funari, SRC. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol.* 2000;73(1-2):243-9.
162. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three diferente races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol.* 2005;99(1):69-73.
163. Cardoso RL, Maboni F, Machado G, Alves SH, Vargas AC de. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *Vete Microbiol.* 2010;142(3-4):432-4.
164. 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.
165. Silva MSS, Cito AMGL, Chaves MH, Lopes JAD. Triterpenóides tipo cicloartanode própolis de Teresina-PI. *Quím Nova.* 2005;28(5):801-4.
166. Castaldo C, Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia.* 2002;73(Supl. 1):s1-6.
167. Ordóñez RM, Zampini IC, Moreno MIN, Isla MI. Potential application of Northern Argentine propolis to control some phytopathogenic bacteria. *Microb Res.* 2011;166(7):578-84.
168. Alves E, Kubota EH. Conteúdo de fenólicos, flavonoides totais e atividade antioxidante de amostras de própolis comerciais. *Rev Ciên Farm Bas Apl.* 2013;34(1):37-41.
169. Trusheva B, Popova M, Bankova V, Simova S, Marcucci MC, Miorin PL, Pasin F da R, Tsvetkova I. Bioactive constituents of Brazilian red propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2006;3(2):249-54.
170. Moreira L, Dias LG, Pereira JA, Estevinho L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of propolis samples from Portugal. *Food Chemic Toxicol.* 2008;46(11):3482-5.
171. Valencia D, Alday E, Robles-Zepeda R, Garibay-Escobar A, Galvez-Ruiz JC, Salas-Reyes M, Jiménez-Estrada M, Velazquez-Contreras E, Hernandez J, Velazquez C. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chem.* 2012;131(2):645-51.
172. Sforcin JM. Review Biological Properties and Therapeutic Applications of Propolis. *Phytother Res.* 2016;30(6):894–905.
173. Busch VM, Pereyra-Gonzalez A, Segatin N, Santagapita PR, Ulrich NP, Buera MP. Propolis encapsulation by spray drying: Characterization and stability. *LWT - Food Sci Technol.* 2017;75:227-35.
174. Tosi EA, Ré E, Ortega ME, Cazzoli AF. Food preservative based on propolis: Bacteriostatic activity of propolis polyphenols and flavonoids upon *Escherichia coli*. *Food Chem.* 2007;104(3):1025-9.
175. Santana HF, Barbosa AAT, Ferreira SO, Mantovani HC. Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. *World J Microbiol Biotechnol.* 2012;28(2):485-91.

176. Búfalo MC, Figueiredo AS, De Sousa JPB, Candeias JM, Bastos JK, Sforcin JM. Anti-poliovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *J Appl Microbiol*. 2009;10(7):1669-80.
177. Gressler LT, Da Silva AS, Machado G, Rosa LD, Dorneles F, Gressler LT, Oliveira MS, Zanette RA, De Vargas AC, Monteiro SG. Susceptibility of *Trypanosoma evansi* to propolis extract in vitro and in experimentally infected rats. *Res Vet Sci*. 2012;93(3):1314-7.
178. Cueto AP, Alves SH, Pilau M. Atividade antiviral do extrato de própolis contra o Calicivírus felino, adenovírus canino 2 e vírus da Diarréia viral bovina. *Ciê Rur*. 2011;41(10):1800-6.
179. Chan GC, Cheung K, Sze DM. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin Rev Allergy Immunol*. 2013;44(3):262-73.
180. Park YK, Ikegaki M, Abreu JS, Alcici NMF. Estudo da preparação dos extratos da própolis e suas aplicações. *Ciê Tecnol Alimentos*. 1998;18(3):313-8.
181. Fischer G, Hübner SO, Vargas GD, Vidor T. Imunomodulação pela própolis. *Arq Inst Bio*. 2008;75(2):247-53.
182. Batista LL, Campesatto EA, Assis ML, Barbosa AP, Grillo LA, Dornelas CB. Comparative study of topical green and red propolis in the repair of wounds induced in rats. *Rev Col Bras Cirur*. 2012;39(6):515-20.
183. Kubota Y, Umegaki K, Kobayashi K, Tanaka N, Kagota S, Nakamura K, Kinitomo M, Shinozuka K. Anti-hypertensive effects of Brazilian propolis in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol*. 2004;31(2):s29-30.
184. 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. *Biol Pharm Bull*. 2005;28(10):1909-14.
185. Yu Y, Si Y, Song G, Lou T, Wang J, Qin S. Ethanolic extract of propolis promotes reverse cholesterol transport and the expression of ATP-Binding cassette transporter A1 and G1 in mice. *Lipids*. 2011;46(9):805-11.
186. Reis JS, Oliveira GB, Monteiro MC, Machado CS, Torres YR, Prediger RD, Maia CS. Antidepressant- and anxiolytic-like activities of an oil extract of propolis in rats. *Phytomedicine*. 2014;21(11):1466-72.

## CAPÍTULO 2 - CARACTERIZAÇÃO FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE *Salmonella* sp EM PRODUTOS AVÍCOLAS

### RESUMO

A produção de alimentos de qualidade e que sejam seguros aos consumidores representa o maior desafio para os estabelecimentos do setor de alimentação. As bactérias são os agentes mais relacionados aos casos de infecção alimentar e, dentre elas, uma das mais comuns é a *Salmonella* sp. O sucesso do controle deste patógeno está relacionado à vigilância epidemiológica das cepas circulantes com uso de técnicas fenotípicas e moleculares para caracterizar os diferentes sorotipos provenientes de diversas fontes. Neste contexto, conhecer as características das populações de *Salmonella* sp que circulam tanto nos animais quanto nos humanos é essencial para entender os mecanismos de associação entre estas cadeias. Com isso, objetivou-se com este estudo caracterizar fenotipicamente e genotipicamente isolados provenientes de amostras de origem alimentar e ambiental obtidos entre os anos de 2015 e 2018. Foram obtidos e sorotipificados 128 isolados de *Salmonella enterica*. Os testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados com os seguintes agentes e concentrações em microgramas: amoxicilina-ácido clavulânico (30µg), cotrimoxazol (trimetropim-sulfametoxazol) (25µg), ciprofloxacina (5µg), enrofloxacina (5µg), ceftiofur (30µg), cloranfenicol (30µg), fosfomicina (200µg) e doxiciclina (30µg). Foram pesquisados dois genes de resistência e nove de virulência. Para realização das análises de reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real foi utilizado como controle positivo cepas de referência assim como para os testes de sensibilidade. Verificaram-se 27 diferentes sorotipos, dentre eles os mais frequentes foram: *Salmonella* Heidelberg, Saintpaul, Typhimurium e Minnesota. Foram identificados 54 isolados multirresistentes. Dos oito antimicrobianos avaliados, para dois deles (cloranfenicol e fosfomicina) todos os isolados foram suscetíveis e aquele com maior número de isolados resistentes foi a ciprofloxacina. Dentre os dois genes de resistência avaliados (*blaCTX-M* e *gyrA*), cerca de 70% dos isolados o albergavam. Dos nove genes de virulência avaliados, três foram identificados em todos os isolados testados (*invA*, *hila* e *sseD*). Para os outros seis, *spvR* foi o que apresentou maior número de isolados nos quais não foi identificado.

**Palavras-chave:** antimicrobianos, contaminação, resistência, sorotipos e virulência.

## PHENOTYPICAL AND GENOTYPICAL CHARACTERIZATION OF *Salmonella* sp IN POULTRY PRODUCTS

### ABSTRACT

Producing quality and safe food for consumers is the biggest challenge at the market. Bacteria are the agents most related to cases of food infection and among them one of the most common is *Salmonella* sp. The successful control of this pathogen is related to the epidemiological surveillance of circulating strains using phenotypic and molecular techniques to characterize the different serotypes from different sources. In this context, knowing the characteristics of the populations of *Salmonella* sp that circulate in both animals and humans is essential to understand the mechanisms of association between these chains. Thus, the aim of this study was to characterize phenotypically and genotypically isolates from food and environmental samples obtained between 2015 and 2018. Isolates of *Salmonella enterica* were obtained and serotyped (128). Antimicrobial susceptibility tests were performed with the following agents and microgram concentrations: amoxicillin-clavulanic acid (30µg), cotrimoxazole (trimethoprim sulfamethoxazole) (25µg), ciprofloxacin (5µg), enrofloxacin (5µg), ceftiofur (30µg), (30µg), phosphomycin (200µg) and doxycycline (30µg). Two resistance and nine virulence genes were searched. For real time polymerase chain reaction (PCR) analysis, reference strains were used as a positive control as well as for sensitivity tests. There were 27 different serotypes, among which the most frequent were: *Salmonella* Heidelberg, Saintpaul, Typhimurium and Minnesota. We identified 54 multiresistant isolates. Of the eight antimicrobials evaluated, for two of them (chloramphenicol and phosphomycin) all isolates were susceptible and the one with the largest number of resistant isolates was ciprofloxacin. Among the two resistance genes evaluated (*blaCTX-M* and *gyrA*), about 70% of the isolates harbored it. Of the nine virulence genes evaluated, three were identified in all isolates tested (*invA*, *hilA* and *sseD*). For the other six, *spvR* presented the highest number of isolates in which it was not identified.

**Keywords:** antimicrobials, contamination, resistance, serotypes and virulence.

## 1. Introdução

A *Salmonella* sp é o principal agente causador de gastroenterite de origem alimentar, provoca uma zoonose complexa que afeta a saúde pública mundial, representando no Brasil causa primária dos surtos em que há identificação do agente etiológico<sup>1,2,3</sup>. Os gastos gerados em decorrência da doença são elevados, sendo a prevenção, prioridade dos órgãos de saúde para evitar maiores despesas com o tratamento<sup>4</sup>. A autoridade europeia em segurança de alimentos (*European Food Safety Authority* - EFSA) estima que o prejuízo econômico gerado pela ocorrência de salmonelose humana ultrapassa três bilhões de euros por ano<sup>5</sup>.

Na Inglaterra e no País de Gales, que possuem um padrão de infecção humana próximo do resto da Europa Ocidental, foram diagnosticados 10.000 casos de salmonelose em 1981, com menos de 5% destes casos devido a *Salmonella* Enteritidis. Já em 1997 os casos se elevaram para 33.000, sendo 65% causados por *Salmonella* Enteritidis<sup>6</sup>. Nos Estados Unidos e na Europa o aumento dos casos de salmonelose causada por *Salmonella* Enteritidis ocorreu no início da década de 80 e o mesmo fenômeno foi observado no Brasil 10 anos depois<sup>6</sup>.

No Brasil, os dados sobre infecções por *Salmonella enterica* são incompletos, uma vez que a notificação de infecções alimentares não é obrigatória. Porém, tais informações são necessárias já que as precárias condições de saneamento básico em algumas regiões faz com que as infecções alimentares sejam um dos principais problemas de saúde no país<sup>7,8</sup>. O estudo realizado por Tavechio et al.<sup>9</sup> utilizando amostras de infecção humana e material não humano, revelou que, em 1991, 1,2% dos isolados de *Salmonella enterica* eram do sorotipo Enteritidis e este número aumentou exponencialmente, atingindo o valor de 64,9% em 1995. Durante o período de 1996-2003, em diferentes localizações geográficas de todo o Estado de São Paulo, foram isoladas de humanos, 3.554 amostras de *Salmonella* sp classificadas em 68 sorotipos diferentes, sendo os sorotipos mais encontrados Enteritidis (67%), Typhimurium (5,2%), *Salmonella enterica* I,4[5],12:i:-(5,1%), Typhi (4%) e Dublin (2,5%)<sup>8</sup>.

A carne de frango pode ser veículo de transmissão de microrganismos patogênicos causadores de doenças veiculadas por alimentos<sup>10</sup>. Segundo Welker et al.<sup>11</sup>, os produtos cárneos são os alimentos mais frequentemente incriminados em surtos representando 36% (80/223), sendo a carne de frango a segunda principal fonte com 30% (24/80). Hoffmann et al.<sup>12</sup> estimam que os produtos derivados da carne de frango são responsáveis por 20% das salmoneloses de origem alimentar. Por isso, há uma grande preocupação no abate de frangos,

relacionada à obtenção de carnes com o menor nível de contaminação possível em todas as etapas do processamento desses animais<sup>13</sup>.

O Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal (DIPOA) do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) conduziu um estudo de prevalência nacional de *Salmonella* sp em carcaças de frango entre 2013 e 2014. Foram analisadas 856 amostras de carne de frango coletadas em 89 abatedouros, em 150 dessas amostras foi identificada a bactéria *Salmonella* sp, o que representa 17,2% de prevalência<sup>14</sup>. De acordo com o MAPA, de fevereiro a março de 2018 foram coletadas 2.592 amostras de carcaças de frangos em abatedouros frigoríficos, sendo detectada a presença de *Salmonella* sp. em 466 amostras (17,97%). A ocorrência de *Salmonella* Enteritidis e de *Salmonella* Typhimurium foi de 0,3% e 0,5% respectivamente, nas culturas isoladas das amostras das carcaças de frango, sendo estes resultados compatíveis ou inferiores aos mundialmente encontrados<sup>15</sup>.

Apesar da implementação de inúmeras medidas de monitoramento e controle de patógenos na produção de frangos de corte, a carne de frango ainda é uma importante fonte de infecções humanas por *Salmonella* sp<sup>16</sup>. Dentre os inúmeros sorotipos existentes, *Salmonella* Enteritidis, *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Infantis estão entre os mais comumente identificados, tanto pelo envolvimento em casos de doenças veiculadas por alimentos, quanto pelo isolamento frequente em todas as etapas da cadeia produtiva, desde a ave viva até a carne de frango processada<sup>2,3</sup>.

Sabendo que a salmonela é responsável por casos de infecções alimentares em seres humanos que ingeriram alimentos contaminados, é importante conhecer a prevalência destes microrganismos nos alimentos e animais, em especial nos alimentos de origem avícola<sup>17</sup>. O Brasil é o segundo maior produtor mundial de carne de frango e, 66,6% desta produção é destinada ao consumo interno, assim é de suma importância este tipo de estudo no país<sup>18</sup>, tanto para melhorar a qualidade dos produtos disponibilizados aos consumidores quanto para implementar melhores programas de monitoramento e controle que permitirão melhores colocações no mercado mundial.

Portanto, avaliar a disseminação de patógenos ao longo da cadeia produtiva de alimentos e obter um melhor entendimento das características fenotípicas e genotípicas dos isolados pertencentes aos sorotipos identificados e circulantes no país, subsidia o entendimento do risco que representam aos humanos, facilita a compreensão de seu perfil de disseminação e auxilia as autoridades na implementação de programas de monitoramento e controle mais eficazes<sup>19</sup>. Além disso, o conhecimento da distribuição dos sorotipos apresenta

as seguintes contribuições epidemiológicas: detecção de novos sorotipos, verificação de alteração na frequência dos já existentes e a distribuição geográfica e temporal deles<sup>20</sup>.

Embora sejam conhecidos mais de 2.600 sorotipos de *Salmonella* sp<sup>18,21,22</sup>, apenas alguns deles são detectados anualmente e atribuídos como causa de infecção em humanos e animais. O estabelecimento de tais sorotipos em uma determinada região pode levar à ocorrência de numerosos surtos de doenças e infecções. Observa-se que há variação quanto à identificação de sorotipos circulantes, considerando local e tempo.

Diferentes métodos são utilizados para caracterização do gênero *Salmonella* sp. Os métodos genotípicos se fundamentam na análise da estrutura genética do microrganismo<sup>23</sup>, enquanto os métodos fenotípicos diferenciam as cepas por meio da caracterização dos produtos da expressão gênica, como por exemplo, respostas bioquímicas, presença de antígenos na superfície celular e o perfil de suscetibilidade a antimicrobianos<sup>24</sup>. Dentre os métodos fenotípicos tradicionais estão a sorotipificação<sup>25</sup>, fagotipificação<sup>26</sup> e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos<sup>27</sup>.

A sorotipificação caracteriza-se como importante ferramenta epidemiológica para identificação de *Salmonella* sp na indústria avícola. Tal método voltou a ser discutido com a publicação da Instrução Normativa N° 20/2016<sup>28</sup> que cita em diferentes momentos a necessidade de se tipificar as salmonelas para que sejam monitorados e controlados determinados sorotipos nos produtos comercializados.

Os antibióticos têm função relevante no combate a doenças infecciosas, porém seu uso inadequado conduziu a resistência e presença de resíduos nos alimentos e no ambiente, o que pode acarretar problemas de saúde pública. A resistência a múltiplas classes de antimicrobianos deve ser monitorada e merece atenção dos diversos segmentos da sociedade envolvidos com a criação de animais, produção de alimentos e medicina humana. Informações científicas sobre a presença, perfil de suscetibilidade bacteriana e caracterização genotípica de *Salmonella* circulando na cadeia de produção de frango e seus produtos, bem como o monitoramento de sorotipos e clones de *Salmonella* multirresistente, são de suma importância para a saúde pública, principalmente devido ao comércio globalizado de carne de aves de corte e ao fato de o Brasil ser país líder nesse cenário.

Neste contexto, o presente estudo teve por objetivo caracterizar fenotipicamente e genotipicamente isolados de *Salmonella* sp de origem avícola e ambiental previamente registrados e identificados.

## 2. Material e Métodos

### 2.1 Ensaios bacteriológicos e seleção de isolados

Foram analisados 128 isolados de *Salmonella* sp obtidos seguindo os procedimentos definidos pela ISO 6579:2017<sup>29</sup> para isolamento convencional, provenientes de produtos alimentares de origem avícola destinados ao consumo humano e amostras ambientais de estabelecimentos industriais nos anos de 2015 a 2018 (Tabela 1).

TABELA 1 - Descrição das amostras avícolas utilizadas no estudo

Local de colheita	Tipo de amostra	Número de amostras / ano				Total
		2015	2016	2017	2018	
Bahia	carcaças	1				1
Distrito Federal	cortes		2			2
	carcaças	1				1
Tocantins	cortes	1				1
	carcaças	1	1			2
	produtos processados	1	1			2
Goiás	cortes	3	4	15	17	39
	carcaças	9	5	4	20	38
	miúdos			3		3
	ovos	2				2
	produtos processados	7	12	3	2	24
	suabes de superfície				12	12
	água de chiller				1	1
<b>Total</b>		<b>26</b>	<b>25</b>	<b>25</b>	<b>52</b>	<b>128</b>

Os isolados foram inoculados em ágar nutriente inclinado incubados a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  por 24 horas e enviados para sorotipificação no Laboratório de Enterobactérias da Fundação Oswaldo Cruz (laboratório de referência no país). A sorotipificação foi realizada baseada na variação antigênica dos antígenos somáticos O e flagelar H seguindo o esquema de Kauffmann-White para sorotipificação de *Salmonella* sp<sup>22</sup>.

### 2.2 Suscetibilidade a antimicrobianos

Os testes de suscetibilidade antimicrobiana foram realizados pelo método de difusão em disco de acordo com o *Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) M02-A11*<sup>30</sup>. Os isolados criopreservados em freezer  $-80^\circ\text{C}$  foram plaqueados em ágar TSA, incubados por 24 horas a  $37\pm 1^\circ\text{C}$  e utilizados para realização do antibiograma. Uma colônia

foi diluída em solução salina (NaCl 0,85%) até se obter turvação de 0,5 na escala de *MacFarland* ( $1 \times 10^6$  UFC/mL). As células em suspensão foram semeadas em placas de ágar Mueller-Hinton com o auxílio de suabes esterilizados. Os discos com antimicrobianos foram inseridos nas placas e incubados a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  de 18 a 24 horas.

O critério de escolha dos antimicrobianos baseou-se na utilização dessas drogas na medicina veterinária e humana e ocorrência de resistência em ambas as áreas. Os antimicrobianos e as concentrações em microgramas testadas foram: amoxicilina-ácido clavulânico (30 $\mu\text{g}$ ), cotrimoxazol (trimetropim-sulfametoxazol) (25 $\mu\text{g}$ ), ciprofloxacina (5 $\mu\text{g}$ ), enrofloxacina (5 $\mu\text{g}$ ), ceftiofur (30 $\mu\text{g}$ ), cloranfenicol (30 $\mu\text{g}$ ), fosfomicina (200 $\mu\text{g}$ ) e doxiciclina (30 $\mu\text{g}$ ). Os resultados foram interpretados de acordo com as zonas de inibição estabelecidas para *Enterobacteriaceae*, e os isolados caracterizados como suscetíveis, intermediários ou resistentes (M100-S24<sup>31</sup>). Foram caracterizados como isolados multirresistentes aqueles que apresentaram resistência a três ou mais classes de antimicrobianos. As classes de antimicrobianos avaliadas neste estudo foram: betalactâmico, fluoroquinolona, anfenicol, sulfonamida, tetraciclina e fosfomicina. As cepas *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram utilizadas como cepas controle da qualidade dos testes.

### 2.3 Pesquisa de genes de virulência e de resistência a antimicrobianos

Os isolados criopreservados foram inoculados em cinco mililitros de caldo BHI e incubados a  $37 \pm 1^\circ\text{C}$  de 18 a 24 horas. Após a incubação, foi realizada a extração de ácido desoxirribonucleico (DNA) cromossômico e plasmidial dos isolados de acordo com as instruções do fabricante Promega com os seguintes kits: Wizard® Genomic DNA Purification Kit e PureYield™ Plasmid Miniprep System, respectivamente. Após o processo de extração, foram obtidos 30  $\mu\text{L}$  do DNA plasmidial concentrado e 100  $\mu\text{L}$  do DNA cromossômico concentrado, os quais foram armazenados a  $-80^\circ\text{C}$ , até o momento da diluição para realização da PCR em tempo real.

As concentrações do DNA cromossômico e plasmidial extraído foram verificadas em nanofotômetro (NanoPhotometer® P-ClassP300, Implen GmbH®, Munique, Alemanha), com leitura no comprimento de onda de 260 nm, os quais foram posteriormente diluídos a 10 ng/ $\mu\text{L}$  e 6 ng/ $\mu\text{L}$ , respectivamente para uso na reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real. Foi avaliada a presença dos genes *invA* (invasão), *lpfA* (adesão), *hilA*, *hilC*, *hilD* (hiper invasibilidade), *spvR* (virulência), *sseD* (sobrevivência), *ssrB* (ligação ao DNA), *ssaR*

(secreção de proteína) e dos genes de resistência à beta-lactâmicos (*blaCTX-M*) e quinolonas (*gyrA*) (Quadro 1). Para realização das análises de PCR em tempo real foi utilizado como controle positivo as cepas de *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e como controle negativo ausência de DNA. As reações de PCR em tempo real foram realizadas no equipamento Step One Plus - Real Time PCR System (Applied Biosystem, USA) e a região de interesse detectada com o auxílio do intercalante de DNA Sybr Green.

QUADRO 1 - Genes, sequência dos primers, tamanho de amplicom (pb), temperatura de *melting* (T<sub>m</sub>) e referência

GENE	SEQUÊNCIA DOS PRIMERS	AMPLICOM	T <sub>m</sub> (°C)	REFERÊNCIA
<i>gyrA</i>	F 5'-TGTCCGAGATGGCCTGAAGC-3' R 5'-TACCGTCATAGTTATCCACG-3'	347pb	52,6	Griggs et al. <sup>32</sup>
<i>blaCTX-M</i>	F 5'-TTTGCATGTGCAGTACCAGTAA-3' R 5'-CGATATCGTTGGTGGTGCCATA-3'	544 pb	56,9	Edelstein et al. <sup>33</sup>
<i>hilA</i>	F 5'-CATGGCTGGTCAGTTGGAG-3' R 5'-CGTAATTCATCGCCTAAACG-3'	150pb	53,7	Mizusaki et al. <sup>34</sup>
<i>hilC</i>	F 5'-GGACTTGTTGCCAGGGATG-3' R 5'-TGACCATTTGCGGGTGAG-3'	241pb	55,9	Mizusaki et al. <sup>34</sup>
<i>hilD</i>	F 5'-ACTCGAGATACCGACGCAAC-3' R 5'-CTTCTGGCAGGAAAGTCAGG-3'	129pb	56,2	Mizusaki et al. <sup>34</sup>
<i>invA</i>	F 5'-CAACGTTTCCTGCGGTACTGT-3' R 5'-CCCGAACGTGGCGATAATT-3'	116 pb	56,7	DePaola et al. <sup>35</sup>
<i>lpfA</i>	F 5'-AGCCAACGTAGTGGTGGATT-3' R 5'-AGACGATGCGACACTGGTTT-3'	127 pb	56,7	Oliveira <sup>36</sup>
<i>spvR</i>	F 5'-GCCGTGAATACAGGTGTTGC-3' R 5'-TCTGTGCGGGCTCTGGGATTA-3'	198 pb	57,3	Oliveira <sup>36</sup>
<i>sseD</i>	F 5'-GCGAGTAACGTAGCACTGGT-3' R 5'-CGTCAGTACACCCGACAACA-3'	303 pb	57	Oliveira <sup>36</sup>
<i>ssrB</i>	F 5'-GCGAGCGTCAGGTTCTTAAA-3' R 5'-CTCATTCTTCGGGCACAGTT-3'	166 pb	55,3	Kohli et al. <sup>37</sup>
<i>ssaR</i>	F 5'-TTTCCTTAAACTGGCGGTGG-3' R 5'-ACTCAGACGTCCAGAAAGGA-3'	191 pb	55,4	Kohli et al. <sup>37</sup>

### 3. Resultados

Os resultados referentes a sorotificação dos 128 isolados de *Salmonella* estão descritos na Tabela 2.

TABELA 2 - Ocorrência dos sorotipos de *Salmonella* identificados

Sorotipos	Nº de isolados (%)	Tipo de amostra	Ano
<i>Salmonella</i> Heidelberg	28 (21,9)	carcaça, corte, miúdo, produto processado e suabe de superfície	2015
			2017
			2018
<i>Salmonella</i> Saintpaul	21 (16,4)	carcaça, corte, miúdo, produto processado e suabe de superfície	2015
			2016
			2017
<i>Salmonella</i> Typhimurium	12 (9,4)	carcaça, corte e suabe de superfície	2018
			2016

Sorotipos	Nº de isolados (%)	Tipo de amostra	Ano
			2017
			2018
<i>Salmonella</i> Minnesota	11 (8,6)	carcaça, corte, produto processado e água de chiller	2015
			2016
			2017
			2018
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5)	6 (4,7)	carcaça, corte, ovo e produto processado	2015
			2018
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	6 (4,7)	carcaça, ovo e produto processado	2015
			2016
<i>Salmonella</i> Agona	5 (3,9)	carcaça, corte e suabe de superfície	2017
			2018
<i>Salmonella</i> Infantis	5 (3,9)	carcaça, corte e produto processado	2016
			2017
<i>Salmonella</i> Senftenberg	5 (3,9)	carcaça e produto processado	2015
			2016
			2017
<i>Salmonella</i> Mbandaka	4 (3,1)	carcaça, corte e suabe de superfície	2016
			2018
<i>Salmonella</i> Brooklyn	3 (2,3)	produto processado carcaça corte	2015
			2016
			2017
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:16)	3 (2,3)	carcaça e produto processado	2015
			2016
<i>Salmonella</i> Newport	3 (2,3)	carcaça, corte e produto processado	2017
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:3,10)	2 (1,6)	corte	2015
			2018
<i>Salmonella</i> Gafsa	2 (1,6)	carcaça e produto processado	2016
<i>Salmonella</i> Akuafo	1 (0,8)	carcaça	2015
<i>Salmonella</i> Alachua	1 (0,8)	corte	2016
<i>Salmonella</i> Albany	1 (0,8)	carcaça	2015
<i>Salmonella</i> Anatum	1 (0,8)	suabe de superfície	2018
<i>Salmonella</i> Braenderup	1 (0,8)	produto processado	2016
<i>Salmonella</i> Cerro	1 (0,8)	suabe de superfície	2018
<i>Salmonella</i> Derby	1 (0,8)	corte	2016
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5:-:1,2)	1 (0,8)	carcaça	2018
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:6,7)	1 (0,8)	carcaça	2015
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:6,8)	1 (0,8)	carcaça	2016
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (rugosa)	1 (0,8)	produto processado	2016
<i>Salmonella</i> Orion	1 (0,8)	corte	2017
<b>Total</b>	128 (100)	7 tipos de amostras	4 anos

Em relação ao local de origem do isolamento, *Salmonella* Saintpaul foi identificada em três estados diferentes dentre os quatro amostrados (Tabela 3). Dentre os sete diferentes tipos de matrizes amostradas, a maior quantidade de isolados obtidos foram para a matriz corte e carcaça 32,8% (42/128) e a menor para água de chiller 0,8% (1/128). Tanto nas matrizes ambientais quanto alimentares o sorotipo mais prevalente representando 21,9% foi *Salmonella* Heidelberg (28/128). Quando os dados são analisados de acordo com o ano de

isolamento dos sorotipos observa-se que em 2015 o sorotipo mais frequentemente encontrado foi Schwarzengrund 19% (5/25), em 2016 Infantis e Minnesota 16% (4/25), em 2017 Saintpaul 40% (10/25) e em 2018 Heidelberg 44% (23/52).

TABELA 3 - Origem dos sorotipos de *Salmonella* identificados

Sorotipos	Local de colheita
<i>Salmonella</i> Saintpaul	DF / GO / TO
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5)*	DF / GO
<i>Salmonella</i> Senftenberg	GO / TO
<i>Salmonella</i> Heidelberg	GO
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	GO
<i>Salmonella</i> Typhimurium	GO / TO
<i>Salmonella</i> Minnesota	DF / GO
<i>Salmonella</i> Agona	GO
<i>Salmonella</i> Infantis	GO
<i>Salmonella</i> Brooklyn	GO
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:3,10)*	GO
<i>Salmonella</i> Mbandaka	GO
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:16)*	GO / TO
<i>Salmonella</i> Gafsa	GO
<i>Salmonella</i> Newport	GO
<i>Salmonella</i> Akafo	GO
<i>Salmonella</i> Orion	GO
<i>Salmonella</i> Alachua	GO
<i>Salmonella</i> Braenderup	GO
<i>Salmonella</i> Anatum	GO
<i>Salmonella</i> Cerro	GO
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5:-:1,2)*	GO
<i>Salmonella</i> Derby	GO
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (rugosa)	GO
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:6,7)*	GO
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:6,8)*	GO
<i>Salmonella</i> Albany	BA

Os percentuais de resistência para os antimicrobianos testados nos 128 isolados de *Salmonella* sp. (Figura 1) são referentes ao somatório dos isolados classificados como resistente e intermediário pelo teste de disco difusão. Os isolados classificados como intermediários (Tabela 5) foram considerados organismos resistentes, já que a aquisição e a transição de suscetível para resistente já havia começado.

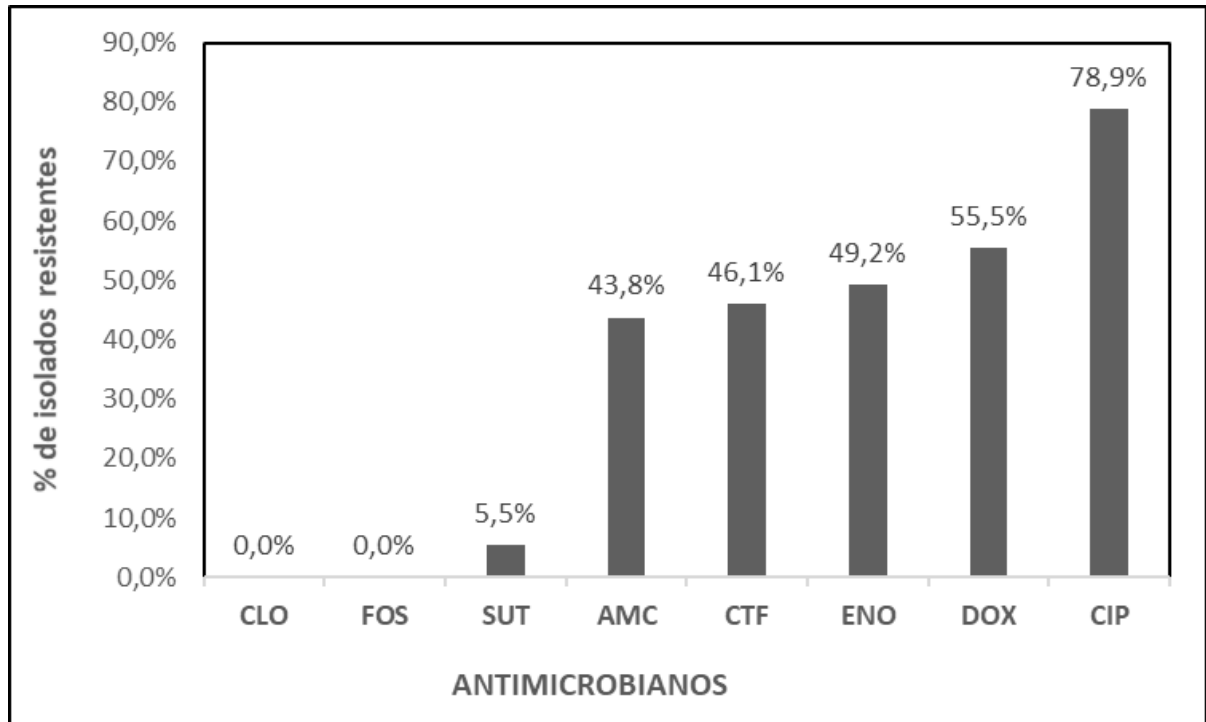


FIGURA 1 - Frequência (%) de resistência antimicrobiana dos 128 isolados de origem avícola e ambiental. CLO: cloranfenicol (30µg), FOS: fosfomicina (200µg), SUT: cotrimoxazol (25µg), AMC: amoxicilina-ácido clavulânico (30µg), CTF: ceftiofur (30µg), ENO: enrofloxacina (5µg), DOX: doxiciclina (30µg) e CIP: ciprofloxacina (5µg).

Verificou-se que 85,2% (109/128) das amostras foram resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos utilizados, apresentando 25 perfis de resistência (Tabela 4). Dentre os 27 diferentes sorotipos avaliados, apenas cinco (18,5%) não apresentaram resistência aos antimicrobianos avaliados (*Salmonella* Braenderup, Derby, Infantis, Mbandaka e Orion). Foi observado perfil de resistência variável para sorotipos pertencentes ao mesmo tipo de amostra.

TABELA 4 - Perfis de resistência para os isolados avaliados.

Sorotipo	Perfis de resistência
<i>Salmonella</i> Agona	CIP ENO CIP ENO DOX AMC CTF CIP ENO DOX
<i>Salmonella</i> Akafo	CIP ENO
<i>Salmonella</i> Alachua	CIP ENO
<i>Salmonella</i> Albany	CIP
<i>Salmonella</i> Anatum	CIP ENO
<i>Salmonella</i> Brooklyn	CTF DOX AMC CIP AMC CTF CIP DOX
<i>Salmonella</i> Cerro	CIP
<i>Salmonella enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:16)*	AMC CTF CIP DOX AMC CTF CIP ENO DOX

Sorotipo	Perfis de resistência
<i>Salmonella enterica</i> subsp. enterica (O:3,10)*	CTF AMC CTF CIP ENO DOX
<i>Salmonella. enterica</i> subsp. enterica (O:4,5)*	DOX AMC CTF CIP CIP ENO DOX CIP SUT DOX CTF CIP ENO DOX
<i>Salmonella. enterica</i> subsp. enterica (O:4,5:-:1,2)*	CIP
<i>Salmonella. enterica</i> subsp. enterica (O:6,8)*	CIP ENO
<i>Salmonella. enterica</i> subsp. enterica (rugosa)	CIP
<i>Salmonella. Gafsa</i>	AMC DOX CIP DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg	CIP CIP DOX CTF CIP CIP ENO DOX CTF CIP ENO AMC CIP ENO DOX AMC CTF CIP DOX AMC CTF CIP ENO DOX
<i>Salmonella</i> Mbandaka	CIP CIP ENO
<i>Salmonella</i> Minnesota	CIP CIP ENO AMC CTF DOX AMC CIP ENO AMC CTF CIP ENO AMC CTF CIP DOX AMC CIP ENO DOX AMC CTF CIP ENO DOX
<i>Salmonella</i> Newport	CIP ENO AMC CTF CIP ENO
<i>Salmonella. Saintpaul</i>	CIP CIP ENO CIP DOX CIP ENO DOX AMC CIP ENO DOX AMC CTF CIP DOX AMC CTF CIP ENO DOX AMC CTF CIP ENO SUT DOX
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	CIP AMC CTF CIP ENO AMC CTF CIP DOX CIP ENO SUT DOX CTF CIP ENO SUT DOX
<i>Salmonella</i> Senftenberg	CIP ENO
<i>Salmonella</i> Typhimurium	CIP DOX CIP DOX CTF SUT DOX CTF CIP ENO DOX AMC CTF CIP DOX AMC CTF CIP ENO DOX

CLO: cloranfenicol (30µg), FOS: fosfomicina (200µg), SUT: cotrimoxazol (25µg), AMC: amoxicilina-ácido clavulânico (30µg), CTF: ceftiofur (30µg), ENO: enrofloxacina (5µg), DOX: doxiciclina (30µg) e CIP: ciprofloxacina (5µg).

Dezenove isolados (14,8%) foram sensíveis a todos antimicrobianos testados e 54 (42,2%) foram multirresistentes, apresentando resistência para três ou mais dentre as seis classes de antimicrobianos avaliadas (Tabela 5). Os 54 isolados multirresistentes abrangem os seguintes dez diferentes sorotipos: Agona, Brooklyn, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:16)\*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:3,10)\*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:4,5)\*, Heidelberg, Minnesota, Saintpaul, Schwarzengrund e Typhimurium. Já os 19 isolados suscetíveis foram classificados como os seguintes 12 sorotipos: Braenderup, Derby, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:4,5)\*, *Salmonella enterica* subsp. *enterica* (O:6,7)\*, Infantis, Mbandaka, Minnesota, Newport, Orion, Saintpaul, Senftenberg e Typhimurium.

TABELA 5 - Perfil de suscetibilidade dos isolados aos antimicrobianos testados

Sorotipo	Tipo de amostra	Ano	AMC	CTF	CIP	ENO	CLO	SUT	FOS	DOX
<i>Escherichia coli</i>	controle	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. Enteritidis</i>	controle	-	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. Agona</i>	corte	2017	S	S	I	I	S	S	S	I
<i>S. Agona</i>	carcaça	2017	S	S	I	I	S	S	S	S
<i>S. Agona</i>	carcaça	2018	S	S	I	I	S	S	S	S
<i>S. Agona</i>	suabe de superfície	2018	R	I	R	I	S	S	S	I
<i>S. Agona</i>	suabe de superfície	2018	R	I	R	I	S	S	S	I
<i>S. Akuafo</i>	carcaça	2015	S	S	I	I	S	S	S	S
<i>S. Alachua</i>	corte	2016	S	S	I	I	S	S	S	S
<i>S. Albany</i>	carcaça	2015	S	S	I	S	S	S	S	S
<i>S. Anatum</i>	suabe de superfície	2018	S	S	I	I	S	S	S	S
<i>S. Braenderup</i>	produto processado	2016	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. Brooklyn</i>	produto processado	2015	S	I	S	S	S	S	S	I
<i>S. Brooklyn</i>	carcaça	2016	I	S	I	S	S	S	S	S
<i>S. Brooklyn</i>	corte	2017	R	I	I	S	S	S	S	I
<i>S. Cerro</i>	suabe de superfície	2018	S	S	I	S	S	S	S	S
<i>S. Derby</i>	corte	2016	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:16)*	produto processado	2016	I	I	S	S	S	S	S	S
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:16)*	carcaça	2015	I	R	I	I	S	S	S	R
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:16)*	produto processado	2015	S	S	I	S	S	S	S	I
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:3,10)*	corte	2018	R	I	I	I	S	S	S	I
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:3,10)*	corte	2015	S	I	S	S	S	S	S	S
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5)*	corte	2018	R	I	I	S	S	S	S	S
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5)*	carcaça	2018	S	S	R	R	S	S	S	I
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5)*	carcaça	2015	S	S	S	S	S	S	S	I
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5)*	ovo	2015	S	S	I	S	S	I	S	I
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5)*	produto processado	2015	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5)*	carcaça	2015	S	I	I	I	S	S	S	R
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:4,5:-:1,2)*	carcaça	2018	S	S	I	S	S	S	S	S
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:6,7)*	carcaça	2015	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (O:6,8)*	carcaça	2016	S	S	I	I	S	S	S	S
<i>S. enterica</i> subsp. <i>enterica</i> (rugosa)	produto processado	2016	S	S	I	S	S	S	S	S
<i>S. Gafsa</i>	produto processado	2016	I	S	S	S	S	S	S	I
<i>S. Gafsa</i>	carcaça	2016	S	S	I	S	S	S	S	I
<i>S. Heidelberg</i>	produto processado	2015	S	S	R	I	S	S	S	I
<i>S. Heidelberg</i>	produto processado	2017	R	R	I	I	S	S	S	R
<i>S. Heidelberg</i>	carcaça	2017	S	S	I	S	S	S	S	I
<i>S. Heidelberg</i>	corte	2017	R	I	I	I	S	S	S	I
<i>S. Heidelberg</i>	miúdo	2017	R	I	I	I	S	S	S	I

Sorotipo	Tipo de amostra	Ano	AMC	CTF	CIP	ENO	CLO	SUT	FOS	DOX
S. Heidelberg	carcaça	2018	S	S	I	I	S	S	S	S
S. Heidelberg	corte	2018	R	I	I	S	S	S	S	I
S. Heidelberg	carcaça	2018	R	I	I	I	S	S	S	I
S. Heidelberg	corte	2018	R	R	I	S	S	S	S	I
S. Heidelberg	corte	2018	I	R	I	I	S	S	S	R
S. Heidelberg	produto processado	2018	R	R	I	I	S	S	S	R
S. Heidelberg	carcaça	2018	R	R	I	I	S	S	S	I
S. Heidelberg	carcaça	2018	R	I	I	I	S	S	S	I
S. Heidelberg	carcaça	2018	R	R	I	I	S	S	S	R
S. Heidelberg	carcaça	2018	I	S	R	I	S	S	S	I
S. Heidelberg	corte	2018	R	I	I	S	S	S	S	I
S. Heidelberg	corte	2018	R	I	R	I	S	S	S	I
S. Heidelberg	suabe de superfície	2018	R	I	I	S	S	S	S	I
S. Heidelberg	suabe de superfície	2018	S	I	I	S	S	S	S	S
S. Heidelberg	carcaça	2018	R	I	I	I	S	S	S	I
S. Heidelberg	carcaça	2018	S	S	R	R	S	S	S	I
S. Heidelberg	carcaça	2018	S	I	I	I	S	S	S	S
S. Heidelberg	carcaça	2018	R	S	I	I	S	S	S	I
S. Heidelberg	corte	2018	R	I	I	I	S	S	S	I
S. Heidelberg	carcaça	2018	R	I	I	S	S	S	S	I
S. Heidelberg	corte	2018	R	I	I	S	S	S	S	I
S. Heidelberg	suabe de superfície	2018	R	I	I	S	S	S	S	I
S. Heidelberg	suabe de superfície	2018	S	S	I	S	S	S	S	S
S. Infantis	carcaça	2016	S	S	S	S	S	S	S	S
S. Infantis	produto processado	2016	S	S	S	S	S	S	S	S
S. Infantis	produto processado	2016	S	S	S	S	S	S	S	S
S. Infantis	produto processado	2016	S	S	S	S	S	S	S	S
S. Infantis	corte	2017	S	S	S	S	S	S	S	S
S. Mbandaka	corte	2016	S	S	S	S	S	S	S	S
S. Mbandaka	suabe de superfície	2018	S	S	I	S	S	S	S	S
S. Mbandaka	carcaça	2018	S	S	I	I	S	S	S	S
S. Mbandaka	corte	2018	S	S	I	I	S	S	S	S
S. Minnesota	carcaça	2015	S	S	I	S	S	S	S	S
S. Minnesota	produto processado	2016	I	I	S	S	S	S	S	I
S. Minnesota	produto processado	2016	I	R	I	S	S	S	S	I
S. Minnesota	produto processado	2016	I	S	I	I	S	S	S	I
S. Minnesota	carcaça	2016	S	S	I	I	S	S	S	S
S. Minnesota	produto processado	2017	S	S	S	S	S	S	S	S
S. Minnesota	corte	2018	I	I	I	I	S	S	S	I
S. Minnesota	carcaça	2018	R	S	I	I	S	S	S	S

Sorotipo	Tipo de amostra	Ano	AMC	CTF	CIP	ENO	CLO	SUT	FOS	DOX
S. Minnesota	água de chiller	2018	I	R	I	I	S	S	S	S
S. Minnesota	carcaça	2018	R	R	I	I	S	S	S	S
S. Minnesota	corte	2018	S	S	I	S	S	S	S	S
S. Newport	produto processado	2017	R	I	I	I	S	S	S	S
S. Newport	carcaça	2017	S	S	I	I	S	S	S	S
S. Newport	corte	2017	S	S	S	S	S	S	S	S
S. Orion	corte	2017	S	S	S	S	S	S	S	S
S. Saintpaul	produto processado	2015	S	S	I	I	S	S	S	S
S. Saintpaul	produto processado	2016	S	S	I	I	S	S	S	S
S. Saintpaul	produto processado	2016	S	S	I	I	S	S	S	R
S. Saintpaul	corte	2016	S	S	S	S	S	S	S	S
S. Saintpaul	corte	2017	R	S	I	I	S	S	S	I
S. Saintpaul	corte	2017	R	I	I	S	S	S	S	I
S. Saintpaul	corte	2017	R	I	I	I	S	S	S	I
S. Saintpaul	miúdo	2017	R	I	I	S	S	S	S	I
S. Saintpaul	corte	2017	S	S	S	S	S	S	S	S
S. Saintpaul	corte	2017	I	I	I	I	S	S	S	I
S. Saintpaul	miúdo	2017	I	I	I	I	S	S	S	I
S. Saintpaul	corte	2017	R	I	I	I	S	S	S	R
S. Saintpaul	corte	2017	R	I	I	I	S	S	S	I
S. Saintpaul	corte	2017	R	I	I	I	S	S	S	I
S. Saintpaul	suabe de superfície	2018	R	I	I	S	S	S	S	I
S. Saintpaul	corte	2018	S	S	I	S	S	S	S	I
S. Saintpaul	suabe de superfície	2018	S	S	I	S	S	S	S	S
S. Saintpaul	corte	2018	R	I	I	S	S	S	S	I
S. Saintpaul	carcaça	2018	R	R	I	I	S	S	S	I
S. Saintpaul	carcaça	2018	R	R	R	I	S	S	S	I
S. Saintpaul	produto processado	2018	I	R	I	S	S	R	S	R
S. Schwarzengrund	carcaça	2015	S	R	I	I	S	R	S	R
S. Schwarzengrund	ovo	2015	S	S	I	I	S	R	S	I
S. Schwarzengrund	carcaça	2015	S	R	I	I	S	R	S	R
S. Schwarzengrund	carcaça	2015	R	R	I	I	S	S	S	S
S. Schwarzengrund	produto processado	2015	S	S	I	S	S	S	S	S
S. Schwarzengrund	produto processado	2016	I	I	I	S	S	S	S	I
S. Senftenberg	carcaça	2015	S	S	I	I	S	S	S	S
S. Senftenberg	produto processado	2015	S	S	R	I	S	S	S	S
S. Senftenberg	produto processado	2015	S	S	I	I	S	S	S	S
S. Senftenberg	produto processado	2016	S	S	S	S	S	S	S	S
S. Senftenberg	carcaça	2017	S	S	S	S	S	S	S	S
S. Typhimurium	carcaça	2015	S	R	S	S	S	R	S	R

Sorotipo	Tipo de amostra	Ano	AMC	CTF	CIP	ENO	CLO	SUT	FOS	DOX
<i>S. Typhimurium</i>	corte	2015	S	R	I	I	S	R	S	R
<i>S. Typhimurium</i>	corte	2015	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. Typhimurium</i>	corte	2015	S	S	I	S	S	S	S	I
<i>S. Typhimurium</i>	corte	2016	S	S	S	S	S	S	S	I
<i>S. Typhimurium</i>	carcaça	2016	S	S	S	S	S	S	S	S
<i>S. Typhimurium</i>	corte	2017	R	R	I	I	S	S	S	I
<i>S. Typhimurium</i>	corte	2018	S	I	I	I	S	S	S	R
<i>S. Typhimurium</i>	carcaça	2018	I	R	R	S	S	S	S	I
<i>S. Typhimurium</i>	corte	2018	S	S	I	S	S	S	S	R
<i>S. Typhimurium</i>	corte	2018	S	S	I	S	S	S	S	R
<i>S. Typhimurium</i>	suabe de superfície	2018	S	S	I	S	S	S	S	S
<i>S. Typhimurium</i>	controle	-	S	S	I	S	S	S	S	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	controle	-	S	S	S	S	S	S	S	S

CLO: cloranfenicol (30µg), FOS: fosfomicina (200µg), SUT: cotrimoxazol (25µg), AMC: amoxicilina-ácido clavulânico (30µg), CTF: ceftiofur (30µg), ENO: enrofloxacin (5µg), DOX: doxiciclina (30µg) e CIP: ciprofloxacina (5µg).

Dentre os 56 (43,8%) isolados resistentes antimicrobianos da classe dos  $\beta$ -lactâmicos (amoxicilina-ácido clavulânico) e os 59 (46,1%) resistentes à cefalosporina (ceftiofur) pertencente à esta mesma classe; 43 (72,9-76,8%) albergavam o gene de resistência *blaCTX-M*. Já em relação ao gene *gyrA* que confere resistência aos antimicrobianos da classe das quinolonas, dentre os 101 (78,9%) isolados resistentes à ciprofloxacina, 100 (99%) deles continham o gene em questão. Enquanto dentre os 63 (49,2%) isolados resistentes à enrofloxacin, 61 (96,8%) deles o gene foi identificado. Dos nove genes de virulência avaliados, três (*invA*, *hilA* e *sseD*) foram identificados em todos os isolados testados (Tabela 6). Para os outros seis genes, *spvR* foi o menos identificado (6,25%).









#### 4. Discussão

De acordo com dados do Ministério da Saúde, os resultados da sorotipificação da bactéria *Salmonella* sp isolada de 2.709 amostras de carne de frango referentes ao programa de Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp<sup>38</sup> coletadas entre 2004 e 2010 indicaram a prevalência de 41,9% de *Salmonella* Enteritidis e 8,5% de *Salmonella* Typhimurium<sup>14</sup>. Para o MAPA, de fevereiro a março de 2018 foram coletadas 2.592 amostras de carcaças de frangos em abatedouros frigoríficos, sendo a ocorrência de *Salmonella* Enteritidis de 0,3% e de *Salmonella* Typhimurium de 0,5% nas amostras de carcaças de frango<sup>15</sup>, representando uma queda na prevalência destes dois sorotipos neste tipo de amostra. *Salmonella* Typhimurium e *Salmonella* Enteritidis destacaram-se como as mais frequentes em casos de infecção alimentar nos países desenvolvidos<sup>39,40</sup>. Particularmente no Brasil, estes sorotipos encontraram-se entre os prevalentemente isolados nas duas últimas décadas, sendo notória sua participação em surtos de origem alimentar e isolados de origem humana<sup>41</sup>. Neste estudo, *Salmonella* Enteritidis não foi identificada, ressaltando que o período de isolamento compreendeu os anos de 2015 a 2018. *Salmonella* Typhimurium foi associada a carne e suabe de superfície com prevalência de 9,4% (12/128).

Relatórios Anuais do Laboratório de Referência Nacional / IOC / FIOCRUZ encaminhados a CGLAB / SVS / MS ao longo dos últimos dez anos, apresentam média anual de 9.000 cepas recebidas *Salmonella* Enteritidis representando o sorotipo mais prevalente, seguido por *Salmonella* Heidelberg, Typhimurium, Agona, Infantis e Hadar, entre isolados de fontes humanas, alimentar, ambiental, animal e matéria prima/rações<sup>42</sup>. Porém, os dados deste estudo sugerem que pode estar havendo uma mudança em relação a prevalência do sorotipo *Salmonella* Enteritidis já que ele não foi identificado dentre os isolados obtidos e *Salmonella* Heidelberg e Saintpaul representaram os sorotipos prevalentes.

Humphrey et al.<sup>43</sup> relataram que, a partir dos anos 80, *Salmonella* Enteritidis foi o sorotipo mais comumente isolado de amostras proveniente da avicultura comercial do Reino Unido e em outros países superando, inclusive, o isolamento de *Salmonella* Typhimurium. Entre 1987/1988, registrou-se, paralelamente, um incremento do número de isolamentos de *Salmonella* Enteritidis também em humanos. Porém, em consonância com os resultados deste estudo, Lane et al.<sup>44</sup> analisando dados da vigilância epidemiológica para as salmoneloses referentes a 67 anos (1945 a 2011) da Inglaterra e País de Gales, observaram o declínio de infecção alimentar causada pelo sorotipo Enteritidis a partir do ano de 1999 após adoção de vacinação das aves, medidas de manejo e surgimento de outros sorotipos, que antes não eram

frequentes. No entanto, este sorotipo ainda é alvo de controle em todo o mundo devido à alta patogenicidade em infecções alimentares. Sendo real e preocupante a possibilidade do surgimento de outros sorotipos que poderão ser tão patogênicos quanto ele, possuindo alto potencial de invasão, o que garante seu estabelecimento e sobrevivência no hospedeiro<sup>45</sup>.

Nos últimos anos a prevalência de *Salmonella* Enteritidis em produtos avícolas apresentou redução gradual. Estudos demonstraram que em algumas regiões ocorreu a identificação de outros, com prevalência diferenciada em diversas regiões<sup>44</sup>, como observado no presente estudo, em que a maior identificação foi do sorotipo Heidelberg. Foley et al.<sup>45</sup> afirmaram que estão ocorrendo alterações na predominância de sorotipos associados a aves comerciais e infecções em humanos nos últimos anos. Estas mudanças se devem ao fato de surgirem programas de erradicação de *Salmonella* e vacinação, em que com a diminuição ou erradicação de alguns sorotipos ocorre a reemergência de outros. Especificamente no caso de *Salmonella* sp, ocorreu a diminuição de *Salmonella* Enteritidis e aumento de outros sorotipos tais como: *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Kentucky dentre amostras de frango, o que é reforçado neste estudo.

Quanto ao sorotipo Typhimurium, historicamente era o agente mais comum em doença de origem alimentar humana<sup>8,46</sup> e associação a doenças em humanos e animais no Irã, representando 31% da infecção por *Salmonella* em humanos<sup>47,48</sup>. Acredita-se que *Salmonella* Typhimurium foi um dos sorotipos mais frequentemente envolvidos em casos humanos de salmonelose no Iraque e em muitos outros países em desenvolvimento<sup>49,50</sup>. Os dados deste estudo indicam, assim como observado pelos pesquisadores citados, que este sorotipo pode estar se reestabelecendo entre os mais prevalentes, já que está entre os três de maior ocorrência neste estudo.

Um estudo desenvolvido em diferentes cidades brasileiras, com intuito de avaliar a prevalência de *Salmonella* sp em 2.679 carcaças de frango congeladas, resultou em 2,7% de positividade, com maior prevalência na cidade de São Paulo entre os anos de 2004 a 2006. Dezoito sorotipos foram identificados, sendo os mais comuns: Enteritidis (48,8%), Infantis (7,6%), Typhimurium (7,2%) e Heidelberg (6,4%)<sup>51</sup>. Em um estudo conduzido em 14 Estados pelo Programa Nacional de Monitoramento da Prevalência e da Resistência Bacteriana em Frango (Prebaf) no mesmo período, totalizando 2710 unidades amostrais de frango analisadas, foi descrito que *Salmonella* Infantis estava presente apenas na região sudeste, *Salmonella* Typhimurium no sudeste, norte e centro-oeste, *Salmonella* Mbandaka no norte e nordeste e *Salmonella* Heidelberg na região sudeste<sup>42</sup>. Os resultados deste estudo sugerem que alguns sorotipos que não eram identificados em certas regiões podem passar a ser, já que *Salmonella*

Heidelberg foi a mais encontrada e a maioria das amostras analisadas foram da região centro-oeste, assim como Rezende et al. (2005) identificaram este sorotipo nesta mesma região. Esta informação é relevante, uma vez que o país tem dimensões continentais e conhecer a dispersão dos sorotipos contribui para o estudo epidemiológico e avaliações do risco. Os dados de sorotipificação e da distribuição geográfica associada à origem da amostra denotaram que Goiás e Tocantins tem características similares.

Há preocupação crescente com outros sorotipos como: Heidelberg, Infantis, Agona, Hadar e Virchow, como causadores de infecções em humanos<sup>52</sup>. Desde o final da década de 70, o sorotipo Infantis tem sido cada vez mais registrado em países como Argentina, Austrália, Brasil, Holanda, Finlândia, Canadá, Hungria, Japão, Nova Zelândia e Rússia<sup>53</sup>. Juntamente com *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Infantis vem sendo reportado pelo envolvimento em casos humanos da doença, e por ser o mais frequentemente isolado tanto na ave viva quanto na carne de frango<sup>3</sup>. No Brasil, este sorotipo também está entre aqueles mais isolados em amostras oriundas de granjas produtoras de frango de corte<sup>51,54</sup>.

Este estudo encontrou cinco isolados do sorotipo Infantis provenientes de carcaça de frango, carne mecanicamente separada resfriada, meio peito salgado congelado e empanado de frango. Apesar de identificados em produtos comercialmente bem aceitos pelos consumidores em geral, em especial crianças, estes mesmos isolados ao serem submetidos aos testes de suscetibilidade se apresentaram sensíveis a todas as classes de antimicrobianos testadas. Isto não minimiza o risco de contaminação representado pelo consumo destes alimentos, os quais devem ser muito bem acondicionados e preparados, a fim de prevenir infecções por cepas altamente virulentas como as aqui identificadas, já que estes isolados apresentaram todos os genes de virulência investigados neste estudo.

Dados preliminares da verificação oficial do programa de monitoramento de *Salmonella* sp nos estabelecimentos de abate de aves no ano de 2017 indicaram 17% (254/1.495) de positividade nas amostras de carcaça de aves analisadas para a presença de *Salmonella* sp no país. Os sorotipos predominantes foram *Salmonella* Heidelberg (56%), *Salmonella* Minnesota (19%) e *Salmonella* Saintpaul (7%). Os sorotipos *Salmonella* Enteritidis e *Salmonella* Typhimurium, que mundialmente estão mais associados aos surtos e casos graves da doença, foram identificados em apenas 0,8% (2/242) e 0,4% (1/242), respectivamente, das amostras analisadas<sup>14</sup>. Estes dados corroboram com os deste estudo em relação ao sorotipo mais prevalente nos produtos avícolas e fortalecem a atenção em relação a

ele, já que *Salmonella* Heidelberg está entre os sorotipos mais comumente isolados de aves e entre os cinco principais sorotipos associados à salmonelose humana<sup>55,56</sup>.

*Salmonella* Heidelberg foi encontrada em seis das sete categorias de tipos de amostra analisadas neste estudo, com perfis de resistência diferentes entre si. Todos os isolados deste sorotipo encontrados em cortes de frango foram multirresistentes assim como o proveniente de miúdo (fígado de frango). Isto reforça a necessidade de informar a população em relação as boas práticas de cocção dos alimentos que podem mitigar o risco inerente ao consumo destes alimentos contaminados.

Scur et al.<sup>57</sup> pesquisaram *Salmonella* sp em suabes de arrasto de galpões, de cloaca de frangos de corte e de ração entre o período de 2006 a 2010, no Estado do Paraná, e identificaram os sorotipos Enteritidis (16,1%), seguido por Heidelberg (5,9%), Typhimurium (5,9%), Hadar (5%), Albany (4,2%) e Saintpaul (4,2%) dentre os 118 isolados de *Salmonella* sp estudados. Pandini et al.<sup>58</sup> também pesquisando *Salmonella* sp em suabes de arrasto de galpões de frangos de corte do Estado do Paraná, entre o ano de 2010 a 2011, obtiveram como sorotipos mais frequentes Heidelberg (12,8%), Mbandaka e Newport (10,3%), Schwarzengrund, Enteritidis e Livingstone (7,7%) dentre as 39 amostras de *Salmonella* sp estudadas.

Nas amostras de suabes de superfície analisadas neste estudo foram encontrados dados semelhantes aos supracitados, sendo também identificados os sorotipos Heidelberg, Mbandaka, Saintpaul e Typhimurium. Voss-Rech et al.<sup>54</sup> detectaram *Salmonella* sp em suabes de arrasto de galpões de frangos de corte, entre o ano de 2009 e 2010, nos Estados de Santa Catarina, Paraná e Mato Grosso do Sul, e obtiveram os sorotipos Minnesota (40,2%), Infantis (14,63%), Heidelberg (7,3%), Senftenberg e Mbandaka (6,1%) e Schwarzengrund (4,9%) dentre os 82 isolados de *Salmonella* sp analisados. Estes autores também não detectaram entre os isolados identificados, o sorotipo Enteritidis, assim como os achados do presente estudo.

Silva<sup>59</sup> avaliou 24 amostras positivas para *Salmonella* sp em corte de frango temperado e observou que houve um destaque para *Salmonella* Heidelberg com 58% de prevalência, seguido dos sorotipos *Salmonella* Minnesota 21%, *Salmonella* Muenchen 17%, *Salmonella* Mbandaka 4%. Ao comparar-se a prevalência nacional obtida pela análise oficial do programa de monitoramento de *Salmonella* sp nos estabelecimentos de abate de aves no ano de 2017, que detectaram como sorotipos predominantes *Salmonella* Heidelberg (56%), Minnesota (19%) e Saintpaul (7%)<sup>14</sup> nota-se semelhança com os resultados encontrados nesta pesquisa, os quais identificaram estes mesmos sorotipos como prevalentes e pode ser explicado pelo período no qual a pesquisa foi realizada. Fator importante a ser considerado é

que dentre os 21 isolados de *Salmonella* Saintpaul (16,4%) analisados neste estudo 14 (66,7%) foram caracterizados como multirresistentes frente aos antimicrobianos testados, incluindo isolados provenientes de miúdos (moela de frango). Isto representa um risco ainda maior para saúde pública em virtude do hábito alimentar brasileiro de não realizar a cocção adequada ao consumir as vísceras animais.

Quanto ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, os altos níveis de resistência observados neste estudo (85,2%) reafirmam a necessidade de reforçar a colaboração entre os setores veterinário e de saúde pública na detecção e notificação adequadas de patógenos zoonóticos veiculados por alimentos. Além disso, estes resultados são importantes porque o tratamento com antimicrobianos é crucial para o manejo adequado da salmonelose humana grave ou invasiva<sup>60</sup>. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os maiores percentuais de resistência obtidos para cepas de *Salmonella* sp isoladas de carcaças de frango no Brasil foram para sulfonamidas (72,4%), florfenicol (59,2%), ceftiofur (22,8%), enrofloxacina (18,4%) e tetraciclina (11,2%)<sup>42</sup>. Tais valores são inferiores aos encontrados neste estudo para ceftiofur (46,1%), enrofloxacina (49,2%) e tetraciclina (55,5%). Porém, para sulfonamidas o valor encontrado neste estudo foi inferior (5,5%) ao encontrado no estudo da ANVISA. Isso reforça a importância quanto ao controle do uso de determinados agentes antimicrobianos na medicina veterinária.

De acordo com dados do Ministério da Saúde, na década de 70 a resistência de *Salmonella* sp aos antimicrobianos era aproximadamente de 17%, porém ao final dos anos 80 esses percentuais subiram para 31% incluindo a resistência às fluoroquinolonas. Tal fato culminou com o aparecimento, em países distintos, de cepas produtoras de diferentes tipos de beta-lactamases<sup>61</sup>. Neste estudo foi observada resistência de 64% (164/256) dos isolados as fluoroquinolonas testadas (ciprofloxacina e enrofloxacina) representando 81,5% (22/27) dos sorotipos avaliados (Tabela 5). Isto pode demonstrar que o aparecimento deste tipo de resistência ainda se encontra em ascensão.

O ceftiofur é um agente antimicrobiano pertencente ao grupo das cefalosporinas de terceira geração ( $\beta$ -lactâmico) intimamente relacionado a ceftriaxona. Sendo a resistência à ceftriaxona um problema de saúde pública em todo o mundo, em virtude de sua administração em crianças nos casos de infecção por salmonela<sup>27, 62, 63</sup>; maior resistência ao ceftiofur pode implicar em maior resistência à ceftriaxona, comprometendo a escolha deste princípio ativo na terapêutica humana para tratamento de infecções por *Salmonella* sp multirresistentes<sup>64</sup>. Neste estudo 46,1% (59/128) dos isolados foram resistentes ao ceftiofur representando 40,7% (11/27) dos tipos de sorotipos avaliados (Tabela 5).

A resistência às sulfonamidas é comum em animais de produção e tem sido amplamente descrita na literatura<sup>65,66,67,68</sup>. Porém, os resultados para esta classe apresentaram menor percentual de resistência (5,5%), tal informação é relevante pois as combinações de trimetoprim / sulfonamidas são bastante usadas na prática veterinária devido ao baixo custo e seu amplo espectro e características clinicamente eficazes<sup>69</sup>. Essa baixa resistência pode demonstrar que o uso deste agente está sendo melhor administrado no setor em questão nos últimos anos.

Neste estudo os maiores percentuais de resistência foram identificados para ciprofloxacina (78,9%), um antimicrobiano da classe das fluoroquinolonas. Dentre os isolados testados, 62,4% resistentes à ciprofloxacina também foram resistentes à enrofloxacina. Tal achado é um problema de saúde pública significativo, pois estes são os medicamentos de escolha utilizados no tratamento de infecções invasivas por *Salmonella* sp não tifoide nos casos em que o trimetoprim / sulfametoxazol ou ampicilina são clinicamente ineficazes<sup>70,71</sup>. Normalmente, mais de 70% das cepas resistentes à ciprofloxacina também apresentam resistência à enrofloxacina devido às suas estruturas semelhantes<sup>72</sup>.

Para enrofloxacina 49,2% dos isolados foram resistentes, outros estudos realizados no Brasil observaram um percentual variando de 4.9% a 19.2%<sup>51,73,74</sup>, o que demonstra que os níveis de resistência à este agente tem aumentado, o que corrobora com as afirmações de que o padrão de prescrição, a disponibilidade e o custo-efetividade das quinolonas como medicamentos prescritos para a maioria das infecções bacterianas resistentes sejam os fatores responsáveis pela evolução rápida e contínua de bactérias resistentes à fluoroquinolonas<sup>75</sup>.

O alto nível de resistência à tetraciclina não surpreende, pois é um medicamento de balcão usado pela maioria dos agricultores para tratar infecções bacterianas<sup>76</sup>. Neste estudo, a doxiciclina apresentou segundo maior percentual de resistência (55,5%). A resistência aos antibióticos tradicionais, como doxiciclina, constituem uma preocupação com a saúde pública, limitando as escolhas terapêuticas para o tratamento da salmonelose em animais e seres humanos. Mais ainda, na maioria dos países em desenvolvimento, muitos desses antibióticos também são usados comumente em terapia humana devido ao seu baixo custo e disponibilidade<sup>77</sup>. Lopes et al.<sup>78</sup>, Yang et al.<sup>79</sup> e Meng et al.<sup>80</sup>, também observaram alta resistência à tetraciclina em *Salmonella* sp isolada de diferentes fontes de alimentos e animais, assim como o encontrado neste estudo.

O uso de cloranfenicol em animais foi proibido no Brasil em 2003<sup>81</sup>. O resultado deste estudo, demonstrou que todos isolados foram suscetíveis a este agente antimicrobiano,

representando um dado importante, podendo indicar que o objetivo de resguardar a eficiência deste princípio ativo tem sido atingido no país. Alta sensibilidade para cloranfenicol também foi observada na Região Sul do Brasil, em que 89,33% (67/75) das cepas de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium isoladas de suínos foram sensíveis a este antimicrobiano<sup>78</sup>. Em outros países como Turquia e Canadá também foi observada uma alta sensibilidade a este medicamento<sup>82,83</sup>, cabendo ressaltar sua aplicabilidade à terapêutica humana.

O aspecto mais preocupante da resistência antimicrobiana é a multirresistência, uma vez que torna a escolha dos antimicrobianos limitada no tratamento de salmonelose<sup>63</sup>. Neste estudo, 42,2% dos isolados foram multirresistentes. A presença deste perfil de isolados também tem sido observada mundialmente. Siriken et al.<sup>82</sup> na Turquia observaram que 92,85% dos isolados de *Salmonella* sp apresentaram multirresistência a mais de quatro antibióticos. No Brasil, Lopes et al.<sup>78</sup> relataram que 60% dos isolados de *Salmonella enterica* sorovar Typhimurium apresentaram multirresistência a membros de pelo menos três classes de agentes antimicrobianos. No Canadá, Sanches-Maldonado et al.<sup>83</sup> notaram a presença de multirresistência em *Salmonella enterica* isolada de dois abatedouros suínos. Prevalência de 100% de cepas de *Salmonella* sp multirresistentes na carne de frango foi observada na Espanha<sup>84</sup> e no Irã<sup>85</sup>.

Acar et al.<sup>86</sup> ao estudarem 161 isolados de *Salmonella* sp provenientes de amostras de alimentos, excretas de animais e clínicas humanas, na Turquia; encontraram *Salmonella* Infantis como o sorotipo prevalente em amostras de carne de frango e resistentes a tetraciclina e sulfonamida. Tais dados foram diferentes dos encontrados neste estudo, já que todos os isolados de *S. Infantis* aqui avaliados foram suscetíveis aos antimicrobianos testados. Em termos gerais, desconsiderando a sorotipificação dos isolados, Acar et al.<sup>86</sup> encontraram 62,7% (37/59) dos isolados resistentes aos antimicrobianos testados dentre as amostras de alimentos. Constataram também que diferentes perfis de resistência podem ser observados de acordo com a origem da amostra, assim como identificado neste estudo.

Baptista et al.<sup>87</sup> ao avaliarem isolados de *Salmonella* sp em frangos vivos e carcaças em matadouros do Rio de Janeiro encontraram 29 (87,87%) isolados sensíveis a todos os antimicrobianos testados (enrofloxacina, ciprofloxacina, norfloxacina, cefalotina, ceftiofur, cefotaxima, amoxicilina / ácido clavulânico e ampicilina), quatro (12,12%) isolados resistentes a pelo menos três antimicrobianos betalactâmicos ou mais e nenhum isolado resistente às fluoroquinolonas. Dados estes que não estão de acordo com os identificados neste estudo, já que a maior resistência dos isolados foi observada para a ciprofloxacina.

A resistência de *Salmonella* sp à alguns agentes antimicrobianos não comumente usados na produção animal pode ocorrer por outros mecanismos tais como: transferências horizontais do elemento genético de resistência móvel, alimentos importados contaminados, antimicrobianos usados no tratamento humano, gado e alimentos e possivelmente resistência cruzada entre os antimicrobianos relacionados<sup>88</sup>. Neste trabalho ao se avaliar a presença dos genes de resistência à beta-lactâmicos (*blaCTX-M*) e quinolonas (*gyrA*), observou-se que 98% dos isolados resistentes à ciprofloxacina apresentaram o gene *gyrA*.

A resistência às quinolonas é determinada fundamentalmente por mecanismos mediados por alterações nos sítios de ligação da enzima DNA gyrase, promovendo a redução do agente antimicrobiano no interior da bactéria<sup>89</sup>, com a substituição de aminoácidos na região determinante da resistência à quinolona<sup>90</sup>. Estudos apontam que uma única mutação no gene *gyrA* é suficiente para conferir resistência ao ácido nalidíxico e suscetibilidade reduzida a fluoroquinolonas, e uma segunda mutação leva a alto nível de resistência à fluoroquinolona<sup>91</sup>, podendo ser este o motivo da alta resistência observada em nosso estudo.

Ao considerar-se que *Salmonella* sp isolada de alimentos apresenta comumente resistência a beta-lactamases<sup>90</sup>, em particular às cefalosporinas, neste estudo ao avaliar-se a presença do gene *blaCTX-M* nos isolados e encontrou-se 70,3% de presença. Vários genes podem codificar a resistência à um mesmo princípio ativo, justificando a prevalência de diversos genes de resistência em isolados bacterianos de aves em todo o mundo<sup>92</sup>. Identificou-se neste estudo a presença do gene de resistência sem manifestação fenotípica no crescimento bacteriano. Provavelmente, isto se deve a novos genes de resistência não identificados ou mutações que conferem resistência a genes não descobertos.

O padrão de virulência de isolados de *Salmonella* sp se apresenta de diversas formas em diferentes pesquisas, os trabalhos de Elkenany et al.<sup>93</sup>, Costa<sup>94</sup>, Oliveira<sup>36</sup> e Moura et al.<sup>95</sup>, tiveram como resultado o gene *invA* amplificado em 100% dos isolados de *Salmonella* sp assim como os resultados encontrados neste estudo. As diferenças encontradas entre os dados deste estudo e dos autores citados podem ter acontecido em virtude da alta variabilidade genética dos indivíduos do gênero *Salmonella* sp lhes conferindo diferentes comportamentos mediante situações semelhantes de estresse. Além disso, as variações na resistência das cepas isoladas podem estar associadas com o país, com o ano, com o tipo de criação, com a granja de procedência do lote, com o sorotipo da *Salmonella* sp e, particularmente, com o antimicrobiano testado<sup>87</sup>.

Neste estudo identificou-se a presença do gene *invA* em todos os isolados, assim como Rowlands et al.<sup>96</sup>, que estudaram fatores de virulência em *Salmonella* sp. isoladas de

alimentos associados ou não a surtos de salmonelose no Brasil, e encontraram 100% de positividade para este gene. A presença do gene *invA* é fundamental na expressão da capacidade de invasão dos tecidos do hospedeiro pelo microrganismo<sup>97</sup>. O gene *hilA* também foi identificado em 100% dos isolados. Esta família de genes é responsável pela produção de proteínas reguladoras cuja expressão é mediada por fatores ambientais<sup>98</sup>.

A presença do gene *lpfA* se deu em 97,7% dos isolados analisados neste estudo. Isto indica que além da capacidade de invasão, eles também podem ser eficientes no processo de adesão e na formação de biofilmes<sup>19</sup>. O gene *lpfA* codifica a fímbria polar longa e está envolvido no processo de adesão às superfícies e às células epiteliais que caracteriza uma etapa essencial e anterior ao processo de formação de biofilmes<sup>99</sup>. Sendo assim, a presença de fímbrias mediada por este gene é importante no processo de infecção. Isto sugere que os isolados deste estudo são altamente virulentos e difíceis de serem eliminados caso se instalem em determinado ambiente biótico ou abiótico.

Os outros três genes estudados também foram identificados na maioria dos isolados avaliados e são importantes para caracterizar a capacidade de sobrevivência destes microrganismos em seus hospedeiros. O gene *ssaR* permite a sobrevivência e replicação de *Salmonella* sp nas células hospedeiras<sup>100</sup>, *ssrB* (regulador transcricional), atua durante os estágios intracelulares da infecção juntamente com os genes *hilA* e *hilD*<sup>101</sup> e *sseD* (encontrado em 100% dos isolados) atua como translocon para proteínas efetoras em *Salmonella* sp intracelular<sup>102</sup>. A presença do gene *spvR* auxilia na distinção dos fatores envolvidos na patogenicidade de *Salmonella* sp. e estão associados com infecção extra intestinal nos homens e nos animais<sup>103</sup>. Em nosso estudo este foi o gene menos detectado, com 82,0% de presença dentre os isolados analisados.

## 5. Conclusões

Pode-se concluir que dentre os sorotipos identificados neste estudo, *Salmonella* Heidelberg foi o prevalente, seguido pelos sorotipos Saintpaul, Typhimurium e Minnesota. Foi observada multirresistência as seis classes de antimicrobianos testadas em 42,2% dos isolados abrangendo dez diferentes sorotipos. Foi observada multirresistência as seis classes de antimicrobianos testadas. Todos os sorotipos identificados apresentaram genes de virulência expressivos para invasão, adesão, multiplicação e dessecação. Sendo assim, representam um risco potencial à saúde dos consumidores.

## REFERÊNCIAS

1. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica - MS/SVS/DEVIT. 2014. Vigilância Epidemiológica das Doenças Transmitidas por Alimentos-VE-DTA. São Paulo, SP. [acesso 10 jul 2019] Disponível em: [https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/270383/mod\\_resource/content/1/Vigil%C3%A2ncia%20Epidemiol%C3%B3gica%20das%20Doen%C3%A7as%20Transmitidas%20por%20Alimentos%20E2%80%93VE-DTA.pdf](https://edisciplinas.usp.br/pluginfile.php/270383/mod_resource/content/1/Vigil%C3%A2ncia%20Epidemiol%C3%B3gica%20das%20Doen%C3%A7as%20Transmitidas%20por%20Alimentos%20E2%80%93VE-DTA.pdf)
2. Center for Disease Control and Prevention. Vital Signs: Incidence and Trends of Infection with Pathogens Transmitted Commonly Through Food - Foodborne Diseases Active Surveillance Network, 10 U.S. Sites, 2006-2013. Morb Mortal Week Rep. 2014;63(15):328-332.
3. European Food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. EFSA J. 2018;16(12):262 p.
4. Lee K, Runyon M, Herrman TJ, Phillips R, Hsieh J. Review of *Salmonella* detection and identification methods: Aspects of rapid emergency response and food safety. Food Control. 2015;47:264-76.
5. EFSA - European Food Safety Authority. EFSA explains zoonotic diseases: *Salmonella*. 2014. [acesso 08 jul 2019] Disponível em: [http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate\\_publications/files/factsheetsalmonella.pdf](http://www.efsa.europa.eu/sites/default/files/corporate_publications/files/factsheetsalmonella.pdf)
6. Mastroeni P, Maskell DJ. *Salmonella* infections: Clinical, immunological and molecular aspects. Cambridge, UK: Cambridge University Press; 2006. 400p.
7. Hofer E, Dos Reis EM. *Salmonella* serovars in food poisoning episodes recorded in Brazil from 1982 to 1991. Rev Inst Med Trop S Paulo. 1994;36(1):7-9.
8. Fernandes SA, Tavechio AT, Ghilardi AC, Dias AM, Almeida IA, Melo LC. *Salmonella* serovars isolated from humans in São Paulo State, Brazil, 1996-2003. Rev Inst Med Trop S Paulo. 2006;48(4):179-84.
9. Tavechio AT, Fernandes SA, Neves BC, Dias AMG, Irino K. Changing patterns of *Salmonella* serovars: increase of *Salmonella* Enteritidis in São Paulo, Brazil. Rev Inst Med trop S Paulo 1996;38(5):327-34.
10. Souza GCD, Gonsalves HRO, Gonsalves HEO, Coêlho JLS. Característica microbiológica da carne de frango. Agropecuária científica no Semi-Árido. UFCG. 2014;10(2):12-17.
11. Welker CAD, Both JMC, Longaray SM, Haas S, Soeiro MLT, Ramos RC. Análise microbiológica dos alimentos envolvidos em surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA) ocorridos no estado do Rio Grande do Sul, Brasil. Rev Bras Biociências. 2010;8(1):44-8.
12. Hoffmann S, Devleeschauwer B, Aspinall W, Cooke R, Corrigan T, Havelaar A, Angulo F, Gibb H, Kirk M, Lake R, Speybroeck N, Torgerson P, Hald T. Attribution of global foodborne disease to specific foods: Findings from a World Health Organization structured expert elicitation. PloS One. 2017;12(9):1-26.
13. Gonçalves PMR, Franco RM, Zamborlini LC. Enumeração de *Enterococos* e coliformes fecais, pesquisa de *Salmonella* e indicação presuntiva de *Proteus*, em cortes e miúdos de frangos (*Gallus domesticus*) congelados. Rev Hig Alimen. 1998;12(54):42-7.
14. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota técnica. Entenda melhor - Salmonela em carne de frango. 2018. [acesso 10 jul 2019] Disponível em:

<http://www.agricultura.gov.br/assuntos/inspecao/produtos-animal/arquivos-publicacoes-dipoa/entenda-melhor-salmonela-em-carne-de-frango/@@download/file/Nota%20t%C3%A9cnica%20Salmonella%20CRISC%2012.03.2018.pdf>

15. Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal. Anuário dos Programas de Controle de Alimentos de Origem Animal do DIPOA. Volume 4. Ano 4. 2018. 31p.
16. Food and Agriculture Organization. World Health Organization. Microbiological Risk Assessment Series, 19. *Salmonella* and *Campylobacter* in chicken meat: meeting report. Rome: FAO, 2009. 66p.
17. Sharr H. Controles de *Salmonella* na União Européia. Conferência Apinco de Ciência e Tecnologia Avícolas, 2003, Campinas. Anais. Campinas: Facta, p.357-368, 2003.
18. ABPA. Associação Brasileira de Proteína Animal. Relatório Anual 2018. São Paulo. 2018. 176p.
19. Mendonça EP. Características de virulência, resistência e diversidade genética de sorovares de *Salmonella* com impacto na saúde pública, isolados de frangos de corte no Brasil. [Tese] Uberlândia: Universidade Federal de Uberlândia, Faculdade de Medicina Veterinária. 2016. 131 p.
20. Alcântara JB. Pesquisa de *Salmonella* sp. em aves criadas em sistema industrial e alternativo. [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2015. 72p.
21. Guibourdenche M, Roggentin P, Mikoleit M, Fields PI, Bockemühl J, Grimont PAD, Weill FX. Supplement 2003-2007 (No. 47) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol. 2010;161(1):26-9.
22. Issenhuth-Jeanjean S, Roggentin P, Mikoleit M, Guibourdenche M, de Pinna E, Nair S, Fields PI, Weill FX. Supplement 2008-2010 (no. 48) to the White-Kauffmann-Le Minor scheme. Res Microbiol. 2014;165(7):526-30.
23. Ferrari RG, Panzenhagen PHN, Conte-Junior CA. Phenotypic and Genotypic Eligible Methods for *Salmonella* Typhimurium Source Tracking. Front Microbiol. 2017;8(2587):1-8.
24. Tenover FC, Arbeit RD, Goering RV. How to select and interpret molecular strain typing methods for epidemiological studies of bacterial infections: a review for healthcare epidemiologists. Infect Control Hosp Epidemiol. 1997;18:426-39.
25. Abbassi-Ghozzi I, Jaouani A, Hammami S, Martinez-Urtaza J, Boudabous A, Gtari M. Molecular analysis and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolates recovered from raw meat marketed in the area of “Grand Tunis”, Tunisia. Pathol Biol. 2012;60(5):e49-54.
26. Majtanova L, Majtan J, Majtan V. Trends in phage types of *Salmonella* enterica serovars Enteritidis and Typhimurium isolated in Slovakia from 1995 to 2009. Diagn Microbiol Infect Dis. 2011;69(4):454-6.
27. Hur J, Jawale C, Lee JH. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. Food Res Inter. 2012;45(2):819-30.
28. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº20, de 21 de outubro de 2016. Ficam estabelecidos o controle e o monitoramento de *Salmonella* spp. nos estabelecimentos avícolas comerciais de frangos e perus de corte e nos estabelecimentos de abate de frangos, galinhas, perus de corte e reprodução.
29. International Organization for Standardization. ISO 6579 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*. Part 1: Detection of *Salmonella* spp. 1a ed. Geneva, Switzerland; 2017. 50 p.
30. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard M02-A11. 11th ed. 2012;32(1):1-76.

31. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24. 2014; 34(1): 1-230.
32. Griggs DJ, Gensberg K, Piddock LJ. Mutations in *gyrA* gene of quinolone-resistant *Salmonella* serotypes isolated from humans and animals. *Antimicrob Agents Chemother.* 1996;40(4):1009-13.
33. Edelstein M, Pimkin M, Palagin I, Edelstein I, Stratchounski L. Prevalence and Molecular Epidemiology of CTX-M Extended-Spectrum  $\beta$ -Lactamase-Producing *Escherichia coli* and *Klebsiella pneumoniae* in Russian Hospitals. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47(12):3724-32.
34. Mizusaki H, Takaya A, Yamamoto T, Aizawa S. Signal Pathway in Salt-Activated Expression of the *Salmonella* Pathogenicity Island 1 Type III Secretion System in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 2008;190(13):4624-31.
35. DePaola A, Jones JL, Woods J, Burkhardt W, Calci KR, Krantz JA, Bowers JC, Kasturi K, Byars RH, Jacobs E, Williams-Hill D, Nabe K. Bacterial and Viral Pathogens in Live Oysters: 2007 United States Market Survey. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(9):2754-68.
36. Oliveira AP de. Suscetibilidade a antimicrobianos e genes de virulência em *Salmonella enterica* de origem avícola. [Tese]. Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia; 2016. 73 p.
37. Kohli N, Crisp Z, Riordan R, Li M, Alaniz RC, Jayaraman A. The microbiota metabolite indole inhibits *Salmonella* virulence: Involvement of the PhoPQ two-component system. *PLoS One.* 2018;13(1):1-18.
38. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº70, de 06 de outubro de 2003, que institui o Programa de Redução de Patógenos - Monitoramento Microbiológico e Controle de *Salmonella* sp. em Carcaças de Frangos e Perus.
39. Threlfall EJ. Epidemic *Salmonella* typhimurium DT 104-a truly international multiresistant clone. *J Antimicrob Chemother.* 2000;46:7-10.
40. Shinohara NKS, Barros VB, Jimenez SMC, Machado ECL, Dutra RAF, Filho JLL. *Salmonella* spp. importante agente patogênico veiculado em alimentos. *Cien Saude Colet.* 2008;13(5):1675-83.
41. Geimba MP, Tondo EC, Brandelli A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from foods involved in human foodborne outbreaks that occurred in the south of Brasil, 1999-2000. *J Food Safety.* 2005;25:173-82.
42. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Relatório de pesquisa em vigilância sanitária de alimentos. Monitoramento da prevalência e do perfil de suscetibilidade aos antimicrobianos em enterococos e salmonelas isolados de carcaças de frango congeladas comercializadas no Brasil. Programa nacional de monitoramento da prevalência e da resistência bacteriana em frango - PREBAF. Brasília; 2012. 171p.
43. Humphrey TJ, Mead GC, Rowe B. Poultry meat as a source of human salmonellosis in England and Wales. Epidemiological overview. *Epidemiol Infect.* 1988;100(2):175-84.
44. Lane CR, Baigue SL, Esan OB, Awofisyo AA, Adams NL, Fisher IST, Grant KA, Peters T, Larkin L, Davies RH, Adak GK. *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis, England and Wales, 1945-2011. *Emerg Infect Dis.* 2014;20(7):1097-104.
45. Foley S L, Nayak R, Hanning IB, Johnson J, Han J, Ricke SC. Population dynamics of *Salmonella enterica* serotypes in commercial egg and poultry production. *Appl Environ Microbiol.* 2011;77(13):4273-9.
46. Braden CR. *Salmonella enterica* serotype Enteritidis and Eggs: a national epidemic in the United States. *Clin Infect Dis.* 2006;43(4):512-7.

47. Rahimi E. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* spp isolated from retail chicken, Turkey, and ostrich by-products in Iran. *Rev Med Vet.* 2012;163(6):271-5.
48. Ranjbar R, Elhaghi P, Shokoozadeh L. Multilocus sequence typing of the clinical isolates of *Salmonella* enterica serovar typhimurium in Tehran hospitals. *Iran J Med Sci.* 2017;42(5):443-8.
49. Deng X, Ran L, Wu S, Ke B, He D, Yang X, Zhang Y, Ke C, Klena JD, Yan M, Feng Z, Kan B, Liu X, Mikoleit M, Varma JK. Laboratory-based surveillance of non-typhoidal *Salmonella* infections in Guangdong Province, China. *Foodborne Pathog. Dis.* 2012;9(4):305-12.
50. Harb A, O'Dea M, Hanan ZK, Abraham S, Habib I. Prevalence, risk factors and antimicrobial resistance of *Salmonella* diarrhoeal infection among children in Thi-Qar Governorate, Iraq. *Epidemiol Infect.* 2017;145(16):3486-96.
51. Medeiros MAN, Oliveira DCN, Rodrigues DP, Freitas DRC. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* in chicken carcasses at retail in 15 Brazilian cities. *Rev Panam Salud Publica.* 2011. 30(6):555-60.
52. Freitas Neto OC, Penha Filho RAC, Barrow P, Berchieri Junior A. Sources of human nontyphoid salmonellosis: a review. *Rev Brasil Ciência Avícola.* 2010;12(1):1-11.
53. Miller T, Prager R, Rabsch W, Fehlhaber K, Voss M. Epidemiological relationship between *Salmonella* Infantis isolates of human and broiler origin. *Lohmann Info.* 2010;45(2):27-31.
54. Voss-Rech D, Vaz CSL, Alves L, Coldebella A, Leão JA, Rodrigues DP, Back A. A temporal study of *Salmonella* enterica serotypes from broiler farms in Brazil. *Poult Sci.* 2015;94(3):433-41.
55. Center for Disease Control and Prevention. *Salmonella* surveillance: annual summary, 2006. U.S. Department of Health and Human Services, Atlanta, GA, 2008.
56. Food and Drug Administration. National Antimicrobial Resistance Monitoring System-enteric bacteria (NARMS): 2011 executive report. U.S. Department of Health and Human Services, Rockville, MD, 2011. 123p.
57. Scur MC, Pinto FGS, De Bona EAM, Weber LD, Alves LF, Moura AC. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. *Afr J Agric Res.* 2014;9(9):823-30.
58. Pandini JA, Da Silva Pinto FG, Muller JM, Weber LD, De Moura AC. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. *Arq Inst Biol.* 2014;XX(X):1-6.
59. Silva FB da. Pesquisa de *Salmonella* spp e *Escherichia coli* em cortes de frango temperado comercializados no município de Rio Verde, Goiás. [Dissertação] Jataí: Universidade Federal de Goiás. 2018. 50p.
60. Adesiji YO, Deekshit VK, Karunasagar I. Antimicrobial-resistant genes associated with *Salmonella* spp. isolated from human, poultry, and seafood sources. *Food Sci Nutr.* 2014;2(4):436-42.
61. Brasil, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual Técnico de diagnóstico laboratorial da *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*, Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz. Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas, Instituto Adolfo Lutz. Brasília: Ministério da Saúde, 2011. 60 p.
62. Chen H, Wang Y, Su L, Chiu C. Nontyphoid *Salmonella* Infection: Microbiology, Clinical Features, and Antimicrobial Therapy. *Pediatrics and Neonatology.* 2013;54:147-52.

63. Abatcha MG, Zakaria Z, Kaur DG, Thong KL. A trends of *Salmonella* and antibiotic resistance. *Adv Life Scie Technol.* 2014;17:9-21.
64. Angulo FJ, Johnson KR, Tauxe RV, Cohen LI. Origins and Consequences of Antimicrobial-Resistant Nontyphoidal *Salmonella*: Implications for the Use of Fluoroquinolones in Food Animals. *Microbial Drug Resistance.* 2009;6(1):77-83.
65. Benacer D, Thong KL, Watanabe H, Puthucheary SD. Characterization of drug resistant *Salmonella enterica* serotype Typhimurium by antibiograms, plasmids, integrons, resistance genes and PFGE. *J Microbiol Biotechnol.* 2010;20(6):1042-52.
66. World Health Organization. Critically important antimicrobials for human medicine. Geneva: WHO; 2011.
67. Proroga YTR, Capuano F, Carullo MR, La Tela I, Capparelli R, Barco L, Pasquale V. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* strains from food of animal origin in Southern Italy. *Folia Microbiol.* 2016;61(1):21-7.
68. European Food Safety Authority. EU summary report on antimicrobial resistance in zoonotic and indicator bacteria from humans, animals and food in 2016. *EFSA J.* 2017;15:1-212.
69. Cosby DE, Cox NA, Harrison MA, Wilson JL, Buhr RJ, Fedorka-Cray PJ. *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: A review: Table 1. *J Appl Poult Res.* 2015;24(3):408-26.
70. Calayag AMB, Paclibare PAP, Santos PDM, Bautista CAC, Rivera WL. Molecular characterization and antimicrobial resistance of *Salmonella enterica* from swine slaughtered in two different types of Philippine abattoir. *Food Microbiol.* 2017;65:51-6.
71. Van TT, Nguyen HN, Smooker PM, Coloe PJ. The antibiotic resistance characteristics of non-typhoidal *Salmonella enterica* isolated from food-producing animals, retail meat and humans in South East Asia. *Int J Food Microbiol.* 2012;154(3):98-106.
72. Marshall BM, Levy SB. Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiol Ver.* 2011;24(4):718-33.
73. Fitch FM, Carmo-Rodrigues MS, Oliveira VGS, Gaspari MV, Santos A, Freitas JB, Pignatari ACC.  $\beta$ -Lactam Resistance Genes: Characterization, Epidemiology, and First Detection of blaCTX-M-1 and blaCTX-M-14 in *Salmonella* spp. Isolated from Poultry in Brazil—Brazil Ministry of Agriculture's Pathogen Reduction Program. *Microbial Drug Resist.* 2016;22(2):164-71.
74. Yamatogi RS, Oliveira HC, Possebon FS, Pantoja JCF, Joaquim JGF, Pinto JPAN, Araújo Junior JP. Qualitative and quantitative determination and resistance patterns of *Salmonella* from poultry carcass. *J Food Protect.* 2016;79(6):950-5.
75. Lamikanra A, Crowe JL, Lijek RS, Odetoyin BW, Wain J, Aboderion AO, Okeke IN. Rapid evolution of fluoroquinolone-resistant *E. coli* in Nigeria temporally associated with fluoroquinolone use. *BMC Infect. Dis.* 2011;11:312.
76. Henton MM, Eagar HA, Swan GE, Vuuren van M. Part VI. Antibiotic management and resistance in livestock production. *S Afr Med J.* 2011;101(8),556-7.
77. Wannaprasat W, Padungtod P, Chuanchuen R. Class 1 integrons and virulence genes in *Salmonella enterica* isolates from pork and humans. *Int J Antimicrob Agents.* 2011;37(5):457-61.
78. Lopes GV, Michael GB, Cardoso M, Schwarz S. Antimicrobial resistance and class 1 Integron-associated gene cassettes in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium isolated from pigs at slaughter and abattoir environment. *Vet Microbiol.* 2016;194:84-92.
79. Yang X, Huang J, Wu Q, Zhang J, Liu S, Guo W, Cai S, Yu S. Prevalence, antimicrobial resistance and genetic diversity of *Salmonella* isolated from retail ready-to-eat foods in China. *Food Control* 2016;60:50-56.

80. Meng X, Zhang Z, Li K, Wang Y, Xia X, Wang X, Xi M, Meng J, Cui S, Yang B. Antibiotic Susceptibility and Molecular Screening of Class I Integron in *Salmonella* Isolates Recovered from Retail Raw Chicken Carcasses in China. *Microb Drug Resist.* 2017;23(2):1-6.
81. Brasil, Instrução Normativa Nº9 de 27 de junho de 2003. Dispõe sobre proibir a fabricação, a manipulação, o fracionamento, a comercialização, a importação e o uso dos princípios ativos cloranfenicol nitrofuranos e os produtos que contenham estes princípios ativos, para uso veterinário e suscetível de emprego na alimentação de todos os animais e insetos. Diário Oficial da União, Brasília (30 jun 2003).
82. Siriken B, Turk H, Yildirim T, Durupinar B, Erol I. Prevalence and Characterization of *Salmonella* Isolated from Chicken Meat in Turkey. *Food Res Int.* 2015;80(5):9-16.
83. Sanches-Maldonado AF, Aslam M, Service C, Bravo CN, Avery BP, Johnson R, Jones TH. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from two pork processing plants in Alberta, Canada. *Int J Food Microbiol.* 2017;241:49-59.
84. Alvarez-Fernández E, Alonso-Calleja C, García-Fernández C, Capita R. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolated from poultry in Spain: Comparison between 1993 and 2006. *Int J Food Microbiol.* 2012;153(3):281-7.
85. Fallah SH, Asgharpour F, Naderian Z, Moulana Z. Isolation and determination of antibiotic resistance patterns in non-typhoid *Salmonella* spp isolated from chicken. *Int J Enteric Pathog.* 2013;1(1):17-21.
86. Acar S, Bulut E, Durul B, Uner I, Kur M, Avsaroglu MD, Kirmaci HA, Tel YO, Zeyrek FY, Soyer Y. Phenotyping and genetic characterization of *Salmonella enterica* isolates from Turkey revealing arise of different features specific to geography. *Int J Food Microbiol.* 2017;241:98-107.
87. Baptista DQ, Santos AFM, Aquino MHC, Abreu DLC, Rodrigues DP, Nascimento ER, Pereira VLA. Prevalência e susceptibilidade antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de frangos vivos e carcaças no estado do Rio de Janeiro. *PesqVet Bras.* 2018;38(7):1278-85.
88. Iwu CJ, Iweriebor BC, Obi LC, Basson AK, Okoh AI. Multidrug-resistant *Salmonella* isolates from swine in the Eastern Cape Province, South Africa. *J Food Prot.* 2016;79(7),1234-9.
89. Lima AL, Rodrigues DP, Araújo MS, Reis EMF, Festivo ML, Rodrigues ECP, Lázaro NS. Sorovares e perfil de susceptibilidade a antimicrobianos em *Salmonella* spp. isoladas de produtos de origem suína. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2016;68(1):39-47.
90. Maka L, Popowska M. Antimicrobial resistance of *Salmonella* spp. isolated from food. *Rocz Panstw Zakl Hig.* 2016;67(4):343-58.
91. Renuka K, Sood S, Das BK, et al. High-level ciprofloxacin resistance in *Salmonella enterica* serotype Typhi in India. *J Med Microbiol.* 2005;54(Pt 10):999-1000.
92. Saliu EM, Vahjen W, Zentek J. Types and prevalence of extended-spectrum beta-lactamase producing Enterobacteriaceae in poultry. *Anim Health Res Rev.* 2017;18(1):46-57.
93. Elkenany R, Elsayed MM, Zakaria AI, El-Sayed SAES, Rizk MA. Antimicrobial resistance profiles and virulence genotyping of *Salmonella enterica* serovars recovered from broiler chickens and chicken carcasses in Egypt. *BMC VetRes.* 2019;15(1):124.
94. Costa, CS de C. Isolamento e caracterização fenotípica e genotípica de *Salmonella* sp em vísceras de frangos. [Dissertação] Goiânia: Universidade Federal de Goiás, Escola de Veterinária e Zootecnia. 2017. 40 p.
95. Moura MS, Oliveira RP, Melo RT, Mendonça EP, Fonseca BB, Rossi DA. Virulence genes and genetic diversity in *Salmonella* spp. isolated from samples of swine origin. *Arq Bras Med Vet Zoo.* 2014;66(5):1367-75.

96. Rowlands REG, Ristori CA, Ikuno AA, Barbosa ML, Jakabi M, Franco BDGM. Prevalence of drug resistance and virulence features in *Salmonella* spp. isolated from foods associated or not with salmonellosis in Brazil. *Rev Inst Med Trop*. 2014;56(6):461-7.
97. Amini K, Salehi TZ, Nikbahkht G, Ranjbar R, Amini J, Ashrafganjooei SB. Molecular detection of *invA* and *spv* virulence genes in *Salmonella* Enteritidis isolated from human and animals in Iran. *Afr J Microbiol Res*. 2010;4(21):2202-10.
98. Foley SL, Lynne AM. Food animal-associated *Salmonella* challenges: pathogenicity and antimicrobial resistance. *J Anim Sci*. 2008;86(14 Suppl):173-87.
99. Gibson DL, White AP, Rajotte CM, Kay WW. *AgfC* and *AgfE* facilitate extracellular thin aggregative fimbriae synthesis in *Salmonella* Enteritidis. *Microbiol*. 2007;153(4):1131-40.
100. Campioni F, Bergamini AMM, Falcão JP. Genetic diversity, virulence genes and antimicrobial resistance of *Salmonella* Enteritidis isolated from food and humans over a 24-year period in Brazil. *Food Microbiol*. 2012;32(2):254-64.
101. Pérez-Morales D, Banda MM, Chau NYE, Salgado H, Martínez-Flores I, Ibarra JA, Ilyas B, Coombes BK, Bustamante VH, Dove SL. The transcriptional regulator SsrB is involved in a molecular switch controlling virulence lifestyles of *Salmonella*. *Plos Pathog*. 2017;13(7):e1006497.
102. Nikolaus T, Deiwick J, Rappl C, Freeman JA, Schröder W, Miller SI, Hensel M. SseBCD Proteins Are Secreted by the Type III Secretion System of *Salmonella* Pathogenicity Island 2 and Function as a Translocon. *J Bacteriol*. 2001;183(20):6036-45.
103. Guiney DG, Fierer J. The role of the *spv* genes in *Salmonella* pathogenesis. *Front Microbiol*. 2011;2:1-10p.

### **CAPÍTULO 3 - ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE PRÓPOLIS FRENTE A *Salmonella* sp DE ORIGEM AVÍCOLA**

#### **RESUMO**

A própolis possui elevado potencial antimicrobiano devido ao alto conteúdo de flavonóides e compostos fenólicos. *Salmonella* sp é um dos patógenos causadores de infecções veiculadas por alimentos, principalmente associadas ao consumo de produtos avícolas crus e malcozidos. O surgimento de um número cada vez maior de isolados com perfis de multirresistência para antimicrobianos, leva à necessidade do estabelecimento de métodos alternativos de controle. Neste contexto, destaca-se o uso da própolis como agente bactericida. Sendo assim, objetivou-se com este estudo avaliar a eficácia antimicrobiana de extratos de dois tipos diferentes de própolis brasileira (verde e vermelha) produzidas por abelhas da espécie *Apis mellifera* e obtidas por dois métodos de extração (ultrassônica e etanólica); frente à isolados de *Salmonella enterica* de diversas fontes. Os 40 isolados de *Salmonella enterica* foram sorotipificados e expostos aos extratos de própolis diluídos de 0,2 a 100 mg/mL<sup>-1</sup> em etanol para avaliação quanto à sua atividade antimicrobiana pela determinação da concentração inibitória e bactericida mínima conforme o método de microdiluição em placas. A própolis apresentou ação variável para efeito inibitório em *Salmonella enterica*, dependente do tipo de própolis e do sorotipo avaliado. Identificou-se que a própolis verde apresentou concentração inibitória mínima variando de 6,25 a 50 mg/mL e a própolis vermelha MIC variando de 3,1 a 25 mg/mL, sendo a ação antimicrobiana mais eficiente da própolis vermelha, independentemente do tipo de extração utilizada para sua obtenção.

**Palavras-chave:** antibacteriano, apícola, MBC, MIC e microdiluição.

## ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF PROPOLIS COMPARED TO *SALMONELLA* SP OF POULTRY ORIGIN

### ABSTRACT

Propolis has high antimicrobial potential due to the high content of flavonoids and phenolic compounds. *Salmonella* sp is one of the pathogens that cause foodborne infections, mainly associated with the consumption of raw and undercooked poultry products. The emergence of an increasing number of isolates with multiresistance antimicrobial profiles leads to the need for the establishment of alternative control methods. In this context, the use of propolis as a bactericidal agent stands out. Thus, this study aimed to evaluate the antimicrobial efficacy of extracts of two different types of Brazilian propolis (green and red) produced by *Apis mellifera* bees and obtained by two extraction methods (ultrasonic and ethanolic); against isolates of *Salmonella enterica* from various sources. The 40 isolates of *Salmonella enterica* were serotyped and exposed to propolis extracts diluted from 0.2 to 100 mg / mL<sup>-1</sup> in ethanol for evaluation of their antimicrobial activity by determining the minimum inhibitory and bactericidal concentration according to the microdilution plate method. Propolis showed variable action for inhibitory effect on *Salmonella enterica*, depending on the type of propolis and the serotype evaluated. It was found that green propolis presented minimum inhibitory concentration ranging from 6.25 to 50 mg / mL and red propolis MIC ranging from 3.1 to 25 mg / mL, being the most efficient antimicrobial action of red propolis, regardless of the type. extraction used to obtain it.

**Keywords:** antibacterial, apiculture, microdilution, MBC and MIC.

## 1. Introdução

A própolis é uma mistura em proporções variáveis de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, coletadas por abelhas melíferas, de brotos, flores e exsudatos de plantas, acrescidas de secreções glandulares, ceras e pólen para elaboração final do produto<sup>1</sup>. Sua coloração, sabor, odor, consistência, composição química e atividade biológica dependem das espécies vegetais que lhes deram origem e da sazonalidade regional, o que também influenciará seu potencial de ação<sup>2,3,4,5</sup>. Isso lhe confere uma complexidade e heterogeneidade de forma tal que podem ser encontrados mais de 300 constituintes na própolis, dentre esses: ácidos graxos e ácidos fenólicos, ésteres, flavonóides, terpenos, aldeídos, alcoóis aromáticos e naftaleno, importantes para suas propriedades físicas, químicas e biológicas<sup>6,7,8,9</sup>.

Este material é utilizado pelas abelhas com o objetivo de proteger a colmeia contra insetos, microrganismos e no reparo de frestas ou danos à própria colmeia<sup>7,10</sup>. Além disso, embalsamar organismos mortos, evitando sua decomposição e disseminação de odores e microrganismos, também é uma das funções da própolis<sup>6,11,12</sup>. A própolis destaca-se tanto pelas suas propriedades terapêuticas, tais como antimicrobiana, anti-inflamatória, cicatrizante, anestésica e anticariogênica<sup>13,14,15</sup>, quanto pela possibilidade da utilização na indústria farmacêutica e alimentícia<sup>16,17,18</sup>, como um conservante.

A utilização de produtos naturais na medicina humana e veterinária tem direcionado um interesse cada vez mais expressivo para os produtos apícolas<sup>3,16,19</sup>. Nos últimos anos, diversos estudos foram publicados demonstrando as propriedades biológicas e a composição de própolis, evidenciando o interesse dos pesquisadores pelo produto e seu potencial para o desenvolvimento de medicamentos alternativos<sup>9,20,21,22</sup>. As indústrias ao redor do mundo passaram a se interessar mais pela própolis a partir do momento em que seus efeitos terapêuticos foram divulgados e após o aumento da procura por remédios naturais pelos homens<sup>23</sup>.

Há na literatura diversos estudos, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, que confirmam a ação bactericida e bacteriostática da própolis<sup>24,25,26</sup>. Esta atividade pode ser atribuída à quantidade e ao tipo de compostos fenólicos que estão presentes nos diferentes tipos de própolis<sup>27,28</sup>. A primeira investigação de atividade antibacteriana da própolis foi descrita por Kivalkins<sup>29</sup> que mostrou o efeito bacteriostático contra *Staphylococcus aureus* e o bacilo tifoide. Pesquisas realizadas desde 2004 evidenciaram ação inibitória do extrato de própolis e de seus constituintes contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas<sup>18,30,31,32,33</sup>.

No Brasil, alguns tipos de própolis já foram caracterizados e classificados. Park et al.<sup>34</sup> classificaram as amostras de própolis brasileira em doze tipos, analisando as características físico-químicas e propriedades biológicas de material coletado em diferentes regiões brasileiras, sendo cinco tipos no Sul, um no Sudeste e seis no Nordeste. Na região de manguezais da Mata Atlântica de Alagoas foi identificado e classificado como grupo 13 outro tipo, denominada própolis vermelha<sup>35,36,37</sup>. Em outro estudo de Park et al.<sup>38</sup>, foi observado que a própolis oriunda do Rio Grande do Sul é uma das que apresenta melhor ação antimicrobiana, juntamente com a encontrada nos Estados da Bahia e Minas Gerais. Apesar de suas distintas composições, foi constatado que amostras de própolis da Europa são muito similares em relação à atividade antimicrobiana quando comparadas com amostras brasileiras<sup>39</sup>.

Nas zonas tropicais, devido às opções de flora, a composição química da própolis é mais diversa, o que aumenta a importância em se conhecer a fonte botânica para sua caracterização. A própolis verde, classificada no grupo 12, contém exsudatos de alecrim do campo (*Baccharis dracunculifolia*) e destaca-se pela presença majoritária dos flavonoides artepelin C e bacarina, os quais não são encontrados em outros grupos de própolis<sup>40,41</sup>. Sendo assim, sua utilização como agente antimicrobiano pode apresentar vantagens em relação aos demais grupos de própolis, em virtude de sua composição fenólica diferenciada<sup>42,43</sup>. Além disso, extratos de própolis verde poderiam ser uma alternativa para a aplicação como sanitizantes. Mutton et al.<sup>44</sup> demonstraram que o uso de extratos de própolis verde como solução sanitizante inibiu o desenvolvimento de bactérias lácticas contaminantes de tanques de fermentação de cana-de-açúcar, sem alterar a atividade das leveduras utilizadas no processo.

A própolis vermelha, classificada no grupo 13, contém exsudatos da leguminosa *Dalbergia ecastophyllum* (rabo de bugio) e destaca-se pela presença majoritária de isoflavonas e neoflavonoides, não encontrados em outros tipos de própolis brasileiras tais como: dihidroxiisoflavona, homopterocarpina, medicarpina e 4,7-dimethoxi-2'-isoflavona, que são responsáveis por sua atividade antimicrobiana, anticancerígena e antioxidante<sup>35,37,45,46</sup>.

O potencial de atividade antimicrobiana de extratos de própolis em geral, constitui uma das atividades biológicas mais estudadas deste produto. Isso se deve a efeitos relacionados a sua baixa toxicidade e a possibilidade de sua utilização como antimicrobiano alternativo à inibição de microrganismos resistentes aos antimicrobianos comumente utilizados<sup>42,43</sup>. A resistência a agentes antibacterianos tem se tornado um importante problema global. Dos dois milhões de pessoas que contraíram alguma doença de origem bacteriana nos

hospitais dos Estados Unidos da América a cada ano, cerca de 70% dos casos envolvem cepas bacterianas que são resistentes a pelo menos uma droga<sup>47</sup>. Em resposta à resistência bacteriana, as principais indústrias farmacêuticas, juntamente com as universidades, têm concentrado esforços em isolar e identificar novos compostos com atividades antibacterianas<sup>48</sup>. Neste contexto, os produtos naturais representam fontes valiosas para o desenvolvimento desses novos compostos<sup>49</sup>, permitindo a descoberta de agentes terapêuticos, não somente para tratar doenças infecciosas, mas também para tratar o câncer, imunodeficiências e outras<sup>50</sup>.

Além disso, a conscientização por parte dos consumidores para uma alimentação sem o uso de conservantes sintéticos, fez com que se tornassem necessárias mais pesquisas para agentes antimicrobianos mais eficientes e com menos efeitos adversos na saúde humana<sup>51</sup>. Esta realidade atual despertou o interesse de pesquisas para a descoberta de novas substâncias conservantes com efeito antimicrobiano, menos agressivo e, os compostos naturais, elaborados a partir de matérias-primas como a própolis, podem ser uma alternativa futura para utilização como antimicrobiano. Sendo assim, objetivou-se com este estudo avaliar a eficácia antimicrobiana de extratos de dois tipos diferentes de própolis brasileira (verde e vermelha) obtidos por dois métodos de extração (ultrassônica e etanólica) produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera*, frente à isolados de *Salmonella enterica* obtidos de amostras de origem alimentar e ambiental e cepas de referência deste mesmo microrganismo.

## **2. Material e Métodos**

### **2.1 Obtenção dos extratos**

Os 22 extratos de própolis utilizados neste estudo são provenientes de própolis verde e vermelha (Quadro 1) em sua forma sólida e foram disponibilizados a partir da parceria com o Centro Universitário SENAI CIMATEC - Bahia. Diversos métodos podem ser utilizados para extração dos componentes bioativos da própolis, tais como: maceração, extração Soxhlet, ultrassônica e por micro-ondas<sup>52</sup>. Em nosso estudo foram executados dois tipos diferentes de extração: etanólica (maceração com etanol, o qual permaneceu em contato com a matéria-prima por um tempo até se chegar na concentração de extrato desejada) e ultrassônica (processamento convencional por maceração combinado a tecnologia do ultrassom).

QUADRO 1 - Extratos de própolis obtidos

Tipo de própolis	Localidade	Tipo de extração	Ano de obtenção
Vermelha	Alagoas	Etanólica	2014
	Alagoas	Ultrassônico	2014
	Alagoas	Etanólica	2016
	Alagoas	Ultrassônico	2016
	Bahia	Etanólica	2016
	Bahia	Ultrassônico	2016
	Canavieiras	Etanólica	2017
	Canavieiras	Ultrassônico	2017
	Canavieiras	Etanólica	2018
	Canavieiras	Ultrassônico	2018
	Belomonte	Etanólica	2018
	Belomonte	Ultrassônico	2018
Verde	Paraná	Etanólica	2013
	Paraná	Ultrassônico	2013
	Minas Gerais	Etanólica	2014
	Minas Gerais	Ultrassônico	2014
	Bahia	Etanólica	2016
	Bahia	Ultrassônico	2016
	Queluzito	Etanólica	2018
	Queluzito	Ultrassônico	2018
	Minas Gerais	Etanólica	2018
	Minas Gerais	Ultrassônico	2018

## 2.2 Isolados de *Salmonella* sp

Foram sorotipificados isolados de *Salmonella* sp obtidos seguindo os procedimentos definidos pela ISO 6579:2017<sup>53</sup> para isolamento convencional, provenientes de produtos alimentares de origem avícola destinados ao consumo humano e amostras ambientais de estabelecimentos industriais. Com base nos resultados da sorotipificação e importância para o agronegócio e saúde pública foram selecionados 40 isolados de *Salmonella* sp provenientes de produtos alimentares de origem avícola destinados ao consumo humano (Quadro 2).

QUADRO 2 - Isolados de *Salmonella* utilizados e suas respectivas fontes

Sorotipo	Fonte	Ano de isolamento
<i>Salmonella</i> Agona	Corte de frango	2017
<i>Salmonella</i> Agona	Carcaça de frango	2017
<i>Salmonella</i> Agona	Frango resfriado com miúdos	2018
<i>Salmonella</i> Agona	Suabe de superfície - gaiola	2018
<i>Salmonella</i> Agona	Suabe de superfície - caminhão	2018
<i>Salmonella</i> Akuafo	Carcaça de frango	2015
<i>Salmonella</i> Alachua	Corte de frango	2016
<i>Salmonella</i> Anatum	Suabe de superfície - caminhão	2018

Sorotipo	Fonte	Ano de isolamento
<i>Salmonella</i> Braenderup	Carne Mecanicamente Separada de frango	2016
<i>Salmonella</i> Brooklyn	Corte de frango	2017
<i>Salmonella</i> Cerro	Suabe de superfície - caminhão	2018
<i>Salmonella</i> Derby	Corte de frango	2016
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ATCC 13076	-
<i>Salmonella</i> Gafsa	Hambúrguer de frango	2016
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Empanado à base de carne de frango	2015
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Frango a Kiev com queijo tipo provolone	2017
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Carcaça de frango	2017
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Filé de peito de frango	2017
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Fígado de frango	2017
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Corte de frango	2018
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Corte de frango	2018
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Linguiça resfriada de frango	2018
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Suabe de superfície - gaiola	2018
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Carcaça resfriada de frango	2018
<i>Salmonella</i> Heidelberg	Carcaça de frango congelada	2018
<i>Salmonella</i> Infantis	Carcaça de frango	2016
<i>Salmonella</i> Infantis	Corte de frango	2017
<i>Salmonella</i> Mbandaka	Corte de frango	2016
<i>Salmonella</i> Minnesota	Carcaça de frango	2015
<i>Salmonella</i> Minnesota	Hambúrguer de frango	2016
<i>Salmonella</i> Minnesota	Linguiça resfriada de frango	2017
<i>Salmonella</i> Newport	Linguiça resfriada de frango	2017
<i>Salmonella</i> Orion	Corte de frango	2017
<i>Salmonella</i> Saintpaul	Corte de frango	2017
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	Carcaça de frango	2015
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	Ovo Integral Desidratado	2015
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	Carcaça de frango	2015
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	Carcaça de frango	2015
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	Empanado à base de carne de frango	2015
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	Hambúrguer de frango	2016
<i>Salmonella</i> Senftenberg	Empanado à base de carne de frango	2015
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028	-

### 2.3 Escolha dos extratos de própolis e diluições utilizadas

Os 22 extratos utilizados neste estudo foram diluídos para as seguintes concentrações: 0,2; 0,4; 0,8; 1,56; 3,125; 6,25; 12,5; 25; 50 e 100 mg/mL<sup>-1</sup> em etanol para que fosse testada e avaliada sua atividade antimicrobiana sobre as cepas de referência *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028). A partir dos resultados obtidos e avaliação do comportamento da *Salmonella* sp frente aos diferentes extratos de própolis, quatro extratos foram escolhidos para uso em 40 isolados de *Salmonella* sp. de amostras de origem avícola e ambiental. A escolha dos extratos de própolis se baseou no fato de que a composição química da própolis, principal fator de ação antimicrobiana, pode ser

influenciada por sazonalidade e região. Além disso, também foi levado em consideração a diferença de ação bacteriostática e bactericida entre os diferentes tipos de própolis avaliados. Assim, escolheram-se as própolis verde e vermelha obtidas pelas duas formas de extração no Estado da Bahia em 2016 para exposição aos isolados, nas mesmas concentrações testadas para as cepas de referência.

#### **2.4 Concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima**

As culturas bacterianas conservadas em ultrafreezer (-80°C) foram descongeladas a temperatura ambiente, em seguida pipetou-se 0,2 mL da suspensão em 10 mL de caldo BHI (*Broth Heart Infusion*) para ativação do microrganismo e os tubos foram incubados em estufa à 37±1°C por 21±3 horas. Após o crescimento bacteriano, com auxílio de uma alça descartável, foi realizada a semeadura pela técnica de estriamento por esgotamento nas placas contendo o ágar BHI. As placas foram incubadas invertidas a 37±1°C por 21±3 horas. Após a incubação foram preparadas suspensões em solução aquosa de NaCl a 0,85% m/v a partir das colônias obtidas do ágar BHI, a uma turbidez de 0,5 da escala de McFarland (bioMérieux), aproximadamente 1,5 x10<sup>8</sup> UFC/mL, a qual foi utilizada nos testes.

Para a determinação de *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) foi utilizado o método de microdiluição em placas de 96 poços descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*<sup>54,55</sup>. Foram testadas dez concentrações de cada extrato de própolis, variando de 0,2 a 100 mg/mL<sup>-1</sup>. A solução de resazurina (0,01% m/v) foi utilizada para determinar a viabilidade dos microrganismos após a exposição à própolis<sup>54,55</sup>. A MIC foi definida a partir da menor concentração de cada extrato de própolis capaz de promover a inibição do crescimento visível de um microrganismo no teste de sensibilidade. Para a *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) foi feita semeadura em ágar BHI ou ágar *Salmonella* diferencial (Meio RajHans) de uma alíquota de 10µL, obtida nos poços sem crescimento bacteriano anteriormente para MIC e incubadas a 37±1°C por 21±3 horas. Assim, a MBC foi obtida a partir da menor concentração capaz de provocar eliminação bacteriana. Todos os testes experimentais foram realizados em duplicata. Foram avaliados 40 isolados de *Salmonella* sp de origem avícola e ambiental e duas cepas de referência, contemplando 20 diferentes sorotipos (Quadro 2). Para os quais foi observado o efeito bacteriostático ou bactericida mediante os diferentes extratos de própolis selecionados para avaliação.

Em nosso estudo não utilizamos o etanol como controle pois já havia na literatura dados comprovando que as concentrações de álcool necessárias para promover a inativação

dos microrganismos sempre eram maiores que as observadas para os extratos de própolis testados, indicando que o efeito observado advém principalmente da constituição química da própolis, sendo o etanol apenas um agente de solubilização dos seus compostos<sup>31,56</sup>.

### 3. Resultados

Todos os 22 tipos diferentes de própolis avaliados apresentaram atividade bacteriostática para as cepas de referência *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028). Sendo os menores valores de MIC (3,1 mg/mL) para *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) observados com seis tipos de própolis da coloração vermelha. Para *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) foi observado menor valor de MIC (1,6 mg/mL) também para um extrato de própolis da coloração vermelha (Tabela 1).

TABELA 1 - Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC) dos extratos de diferentes amostras de própolis brasileiro obtidos por extração etanólica e ultrassônica em concentrações variando de 0,2 a 100mg/mL<sup>-1</sup>

Extratos	<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076)		<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	
	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)	MIC (mg/mL)	MBC (mg/mL)
VoEA114	3,1	3,1	1,56	3,1
VoUA114	6,25	6,25	6,25	25
VoEA116	3,1	6,25	6,25	6,25
VoUA116	3,1	6,25	6,25	6,25
VoEBa16	3,1	25	3,1	25
VoUBa16	3,1	25	6,25	12,5
VoECa17	6,25	25	3,1	6,25
VoUCa17	6,25	6,25	6,25	25
VoECa18	6,25	12,5	6,25	25
VoUCa18	3,1	>100	6,25	12,5
VoEBe18	12,5	25	6,25	12,5
VoUBE18	12,5	12,5	12,5	12,5
VeEPr13	6,25	100	6,25	100
VeUPr13	6,25	100	6,25	100
VeEMG14	12,5	100	6,25	100
VeUMG14	12,5	25	25	100
VeEBa16	12,5	>100	6,25	50
VeUBa16	12,5	>100	25	>100
VeEQu18	6,25	50	25	100
VeUQu18	25	>100	12,5	50
VeEMG18	6,25	50	6,25	25
VeUMG18	12,5	50	6,25	25

Legenda: Vo - própolis vermelho, Ve - própolis verde, E - extração etanólica, U - extração ultrassônica, Al - Alagoas, Ba - Bahia, Ca - Canavieiras, Be - Belomonte, Pr - Paraná, MG - Minas Gerais e Qu - Queluzito,

De todos os extratos de própolis analisados, quatro não apresentaram atividade bactericida para as cepas de referência *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), estimando-se então que, para estes extratos, a concentração de própolis que promoveria tal efeito estaria acima da maior concentração testada neste estudo (100 mg/mL). Tanto para *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) quanto para *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) a própolis que apresentou menor MBC, representando melhor efeito bactericida, foi a vermelha obtida por extração etanólica em Alagoas no ano de 2014, com concentração bactericida mínima de 3,1 mg/mL para ambas as cepas controle (Tabela 1).

A partir dos resultados obtidos para as cepas de referência e avaliação do comportamento da *Salmonella* sp frente aos diferentes extratos; foram selecionados extratos de própolis verde e vermelha obtidos pelos dois diferentes métodos de extração na Bahia em 2016, para uso nos 40 isolados de *Salmonella enterica* de amostras de origem avícola e ambiental. Para estes quatro extratos de própolis selecionados observou-se que os valores de MIC variaram da concentração de 3,1 a 25 mg/mL e os de MBC de 12,5 a >100 mg/mL, quando testadas frente às cepas de referência *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028).

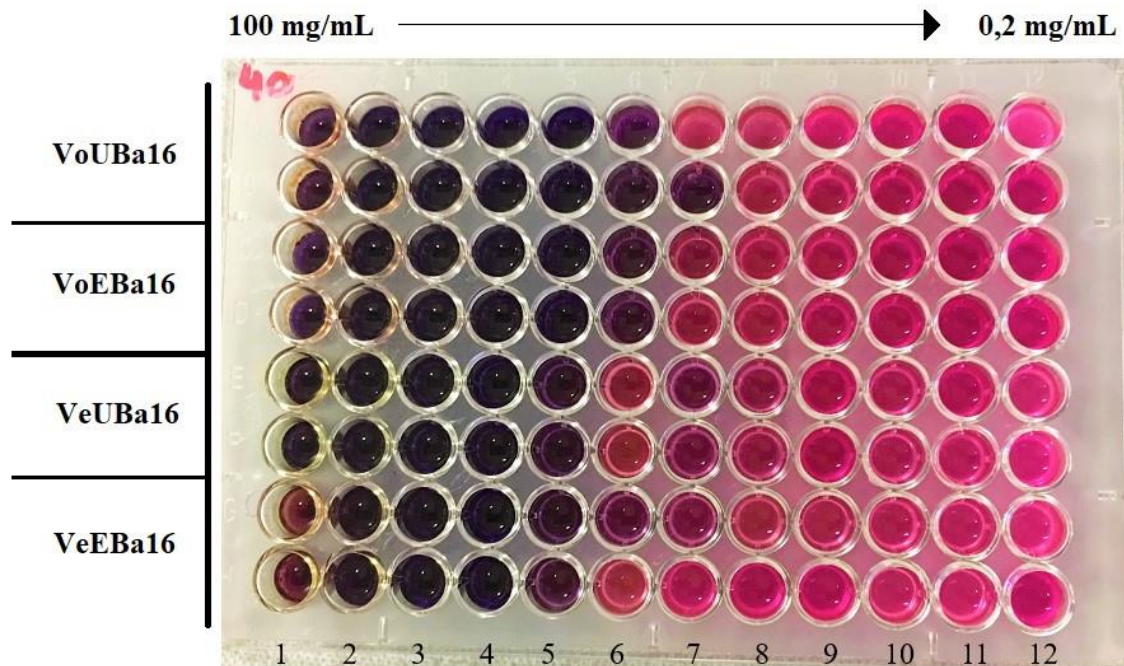
Para os 40 isolados de *Salmonella* sp de origem avícola e ambiental (Tabela 2) avaliados, o menor valor de MIC encontrado foi na concentração de 3,1 mg/mL para a própolis vermelha obtida por extração ultrassônica frente aos sorotipos *Salmonella* Saintpaul, Schwarzengrund e Senftenberg, sendo que para este último sorotipo a própolis vermelha obtida por extração etanólica também apresentou o mesmo efeito bacteristático. O menor valor da concentração de MBC (6,25 mg/mL) foi observado para a própolis vermelha obtida por ambos métodos de extração analisados frente ao sorotipo *Salmonella* Senftenberg, sendo este o sorotipo mais suscetível aos extratos das própolis avaliadas independentemente do tipo de extração (Figura 1).

TABELA 2 - Determinação de *Minimum Inhibitory Concentration* (MIC) e *Minimum Bactericidal Concentration* (MBC) dos extratos de própolis verde e vermelho da Bahia obtidos por extração etanólica e ultrassônica em concentrações variando de 0,2 a 100mg/mL<sup>-1</sup>

Isolados	VoEBa16		VoUBa16		VeEBa16		VeUBa16	
	MIC (mg/ mL)	MBC (mg/ mL)	MIC (mg/ mL)	MBC (mg/ mL)	MIC (mg/ mL)	MBC (mg/ mL)	MIC (mg/ mL)	MBC (mg/ mL)
<i>Salmonella</i> Agona	12,5	50	12,5	50	12,5	100	12,5	50
<i>Salmonella</i> Agona	6,25	50	6,25	50	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Agona	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5
<i>Salmonella</i> Agona	12,5	12,5	12,5	25	12,5	50	12,5	25
<i>Salmonella</i> Agona	6,25	25	12,5	25	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Akafo	12,5	25	12,5	25	12,5	50	12,5	25
<i>Salmonella</i> Alachua	12,5	25	12,5	25	12,5	25	12,5	25
<i>Salmonella</i> Anatum	12,5	25	6,25	12,5	12,5	100	12,5	50
<i>Salmonella</i> Braenderup	12,5	25	12,5	50	12,5	50	12,5	100
<i>Salmonella</i> Brooklyn	12,5	12,5	12,5	12,5	12,5	50	12,5	25
<i>Salmonella</i> Cerro	12,5	25	12,5	25	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Derby	12,5	25	12,5	50	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Gafsa	12,5	25	12,5	25	12,5	50	12,5	25
<i>Salmonella</i> Heidelberg	12,5	50	12,5	50	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg	6,25	25	12,5	25	12,5	50	12,5	25
<i>Salmonella</i> Heidelberg	6,25	25	6,25	25	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg	6,25	25	6,25	25	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg	12,5	25	12,5	25	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg	12,5	50	12,5	50	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg	6,25	25	6,25	50	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg	6,25	25	12,5	25	25	100	25	>100
<i>Salmonella</i> Heidelberg	6,25	25	12,5	25	50	>100	25	>100
<i>Salmonella</i> Heidelberg	6,25	12,5	6,25	12,5	6,25	50	6,25	25
<i>Salmonella</i> Heidelberg	6,25	25	12,5	50	12,5	100	25	>100
<i>Salmonella</i> Infantis	12,5	50	12,5	50	12,5	100	12,5	>100
<i>Salmonella</i> Infantis	12,5	100	6,25	12,5	25	>100	25	>100
<i>Salmonella</i> Mbandaka	6,25	50	6,25	12,5	50	>100	25	>100
<i>Salmonella</i> Minnesota	6,25	25	6,25	12,5	50	>100	25	>100
<i>Salmonella</i> Minnesota	12,5	100	6,25	25	25	>100	25	>100
<i>Salmonella</i> Minnesota	12,5	100	12,5	100	25	>100	25	>100
<i>Salmonella</i> Newport	25	100	25	100	25	>100	25	>100
<i>Salmonella</i> Orion	25	100	25	100	25	>100	25	>100
<i>Salmonella</i> Saintpaul	25	50	3,1	25	50	>100	50	100
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	25	50	12,5	25	25	>100	25	>100
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	25	100	3,1	>100	50	>100	25	>100
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	12,5	100	12,5	100	25	>100	12,5	>100
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	12,5	100	25	100	12,5	>100	12,5	>100
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	6,25	50	25	100	25	>100	25	>100
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund	12,5	50	6,25	12,5	25	>100	25	>100
<i>Salmonella</i> Senftenberg	3,1	6,25	3,1	6,25	6,25	50	6,25	12,5

Legenda: Vo - própolis vermelho, Ve - própolis verde, E - extração etanólica, U - extração ultrassônica, Ba - Bahia.

### CONCENTRAÇÕES DECRESCENTES DO EXTRATO DE PRÓPOLIS



Legenda: Vo - própolis vermelho, Ve - própolis verde, E - extração etanólica, U - extração ultrassônica, Ba - Bahia.

FIGURA 1 - Microplaca do sorotipo testado mais suscetível (*Salmonella* Senftenberg) após 24 horas de incubação e adição da solução de resazurina. As colunas de 2 a 11 correspondem respectivamente às seguintes diluições de cada extrato: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,8; 0,4 e 0,2 mg/mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A coluna 1 representa o controle de coloração do extrato frente ao corante (ausência do microrganismo com adição do extrato da própolis). 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.

Avaliando-se cada tipo de própolis isoladamente observou-se que para a própolis vermelha obtida por extração etanólica o efeito bacteriostático variou de 3,1 mg/mL para *Salmonella* Senftenberg a 25 mg/mL para *Salmonella* Newport, Orion, Saintpaul e Schwarzengrund. Já o efeito bactericida variou entre a concentração 6,25 mg/mL para *Salmonella* Senftenberg a 100 mg/mL para *Salmonella* Infantis, Minnesota, Newport, Orion e Schwarzengrund. Quanto à extração ultrassônica, foi observado efeito bacteriostático variando a partir da concentração de 3,1 mg/mL para *Salmonella* Saintpaul, Schwarzengrund e Senftenberg a 25 mg/mL para *Salmonella* Newport, Orion e Schwarzengrund. Seu efeito bactericida variou da concentração 6,25 mg/mL para *Salmonella* Senftenberg a 100 mg/mL para *Salmonella* Minnesota, Newport, Orion e *Salmonella* Schwarzengrund. Para o sorotipo *Salmonella* Schwarzengrund isolado de amostras de ovo integral desidratado mediante este tipo de própolis houve inibição, porém sua concentração bactericida mínima não pôde ser

determinada pois, provavelmente, encontra-se acima da maior concentração testada neste estudo, indicando que este isolado somente será eliminado mediante a presença de maiores concentrações deste tipo de própolis.

Para a própolis verde obtida por extração etanólica observou-se o efeito bacteriostático a partir da concentração de 6,25 mg/mL para *Salmonella* Senftenberg e Heidelberg a 50 mg/mL para *Salmonella* Heidelberg, Mbandaka, Minnesota, Saintpaul e Schwarzengrund. Já seu efeito bactericida variou entre as concentrações de 12,5 mg/mL para *Salmonella* Agona isolada de amostras de frango resfriado com miúdos e 100 mg/mL para *Salmonella* Agona isolada de amostras de corte congelado de frango (coxa e sobrecoxa), Anatum, Heidelberg e Infantis. Para este extrato de própolis não foi possível determinar a concentração bactericida mínima para os isolados de *Salmonella* Heidelberg isolada de suabe de superfície (gaiola); Infantis, Mbandaka, Orion e Saintpaul, isoladas de amostras de cortes salgado e congelado de frango (meio peito sem osso, pele e filezinho); Minnesota, isolada de amostras de carcaça, hambúrguer e linguiça resfriada de frango; Newport, isolada de amostras de linguiça resfriada de frango e Schwarzengrund, isolada de amostras de carcaça de frango, ovo integral desidratado, empanado à base de carne de frango e hambúrguer de frango. Já por extração ultrassônica seu efeito bacteriostático variou da concentração de 6,25 mg/mL para *Salmonella* Senftenberg e Heidelberg a 50 mg/mL para *Salmonella* Saintpaul. Seu efeito bactericida variou de 12,5 mg/mL para *Salmonella* Agona e Senftenberg a 100 mg/mL para *Salmonella* Braenderup e Saintpaul.

#### 4. Discussão

A atividade antimicrobiana de diferentes extratos de própolis utilizando os mesmos princípios deste estudo também foi avaliada por outros pesquisadores. Silva et al.<sup>57</sup>, assim como neste estudo, ao avaliarem a atividade antimicrobiana de vários extratos de própolis de diferentes regiões do Brasil encontraram os melhores resultados de MIC para uma própolis vermelha proveniente do Estado de Alagoas. Pinheiro et al.<sup>58</sup> ao avaliarem as propriedades de inibição antibacteriana dos diferentes tipos de própolis por meio de uma revisão da literatura, também observaram que dentre os estudos avaliados, a própolis vermelha se mostrou muito eficaz tanto para bactérias Gram-negativas quanto Gram-positivas. Porém, no estudo supracitado, a própolis verde não foi efetiva, o que representa um desacordo em relação aos dados deste estudo, já que a própolis verde apresentou efeito bacteriostático e bactericida, ainda que com menor eficiência quando comparada com a

própolis vermelha. Machado et al.<sup>59</sup>, ao realizarem um estudo de caracterização química, capacidade antioxidante e atividade antimicrobiana de oito extratos de própolis obtidos por extração supercrítica e etanólica, encontraram melhor atividade antimicrobiana para a própolis vermelha em relação às outras avaliadas (verde e marrom), frente aos microrganismos avaliados, corroborando com o presente estudo. Resultados semelhantes também foram relatados em outros estudos descrevendo forte atividade antimicrobiana da própolis vermelha do Brasil<sup>37,60</sup>.

Pode-se observar neste estudo, que os mesmos sorotipos tiveram comportamentos diferentes em relação a tolerância e sobrevivência mediante os extratos de própolis avaliados, mesmo aqueles provenientes de um mesmo tipo de fonte de isolamento (Tabela 2). Os seguintes isolados se comportaram de forma semelhante à cepa referencial *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) frente aos extratos testados, apresentando os mesmos valores de MIC e MBC: *Salmonella* Schwarzengrund, Infantis e Saintpaul. Em relação à cepa referencial *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) os seguintes isolados se comportaram de forma semelhante frente aos extratos testados, apresentando os mesmos valores de MIC e MBC: Heidelberg, Senftenberg, Infantis, Mbandaka, Minnesota, Newport, Orion, Saintpaul, Schwarzengrund e Agona.

A MIC encontrada neste estudo (3,1 mg/mL) está dentro da faixa de valores descritas por Przybylek & Karpinski<sup>61</sup>, que ao caracterizarem os últimos estudos envolvendo atividade antimicrobiana de própolis observaram que normalmente estudos com *Salmonella* sp encontram resultados para MIC variando de 0,032-14,7 mg/mL. As altas concentrações utilizadas neste estudo foram definidas embasadas em resultados obtidos por estudos realizados anteriormente, que demonstraram que a própolis possui menor atividade frente a microrganismos Gram-negativos. O efeito inibitório da própolis de diversas regiões está sendo amplamente estudado contra uma variedade de bactérias, apresentando até o momento maior efetividade nas espécies Gram-positivas<sup>59,61,62,63</sup>. Porém, várias pesquisas evidenciaram sua ação inibitória contra bactérias Gram-negativas, embora a maior parte destes estudos tenham encontrado baixa atuação dos extratos testados<sup>30,31</sup>. Uma das hipóteses é que os compostos fenólicos que estão presentes nos extratos de própolis e são responsáveis pelos seus mecanismos de ação antimicrobiana, atuam sobre a estrutura da parede celular<sup>47,64,65</sup>, alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática aos íons, causando a dissipação do potencial de membrana<sup>24</sup>.

Sendo o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana essencial para a bactéria manter a síntese de ATP, o transporte pela membrana plasmática e a motilidade, tal

efeito contribuirá para a ação citotóxica da própolis<sup>66,67</sup>. Portanto, diferenças nas paredes celulares microbianas poderão atuar modificando os efeitos da própolis, de forma que microrganismos Gram-positivos sejam mais suscetíveis pois sua parede celular é mais permeável, possibilitando que agentes externos alterem com maior facilidade sua membrana plasmática. Em contrapartida, bactérias Gram-negativas, apesar de possuírem uma estrutura menos rígida de parede celular que as Gram-positivas, são quimicamente mais complexas e com maior teor lipídico, o que podem lhes conferir maior resistência ao extrato de própolis<sup>30,62</sup>.

Porém, isto não inviabiliza os estudos, pois sua atuação frente a microrganismos Gram-negativos também é descrita na literatura e nos resultados deste estudo observamos que os quatro extratos de própolis testados inibiram todos os isolados avaliados, de forma tal que não foi observada resistência a nenhuma concentração testada. Mas, em relação ao efeito bactericida houve alguns isolados que, apesar de inibidos, não foram inativados, sugerindo que estes representam os mais resistentes dentre os testados neste estudo. Mesmo assim, tais extratos poderiam ser utilizados na indústria de alimentos como suplemento alimentar na dieta de animais de produção (incorporando diluições destes extratos nas rações e/ou água dos animais), sanitizantes (por aspersão nas carcaças) ou até mesmo conservantes (incorporados em embalagens inteligentes)<sup>68,69</sup>.

Os resultados deste estudo aproximam-se de diversos outros estudos, que descreveram a atividade antimicrobiana de própolis europeia frente *Salmonella choleraesuis* e observaram para o extrato aquoso um MIC de 2,5 mg/mL e MBC de 5 mg/mL<sup>70</sup>. Kalia et al.<sup>71</sup>, ao avaliarem o efeito antibacteriano de própolis em *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, encontraram um MIC de 160 mg/mL e MBC de 250 mg/mL para o extrato etanólico de própolis indiana. Gomes et al.<sup>72</sup> ao avaliarem a atividade antibacteriana *in vitro* da própolis marrom do Mato Grosso do Sul frente a *Salmonella* sp encontram um MIC de 9,30 mg/mL. Nina et al.<sup>73</sup> ao avaliarem a atividade antibacteriana do extrato metanólico de própolis do Chile coletadas em diferentes regiões contra *Salmonella* sp observaram concentrações variando de 0,625 mg/mL a 0,25 mg/mL. Essas discrepâncias em relação aos valores de MIC e MBC encontrados nos estudos, podem ser explicadas pelas diferentes propriedades químicas de cada extrato utilizado assim como pelas diferentes extrações e concentrações de extrato aplicadas.

## 5. Conclusões

Própolis vermelha e verde apresentaram efeito inibitório e bactericida para *Salmonella enterica*, com ação diferenciada conforme o sorotipo avaliado. O sorotipo mais suscetível aos extratos de própolis avaliados foi *Salmonella* Senftenberg e aqueles com resposta variável foram *Salmonella* Agona, Braenderup, Heidelberg, Infantis, Minnesota, Schwarzengrund, Newport, Orion, Saintpaul e Anatum.

A própolis pode ser uma alternativa viável como antimicrobiano, por possuir potencial de ação expressivo para *Salmonella* sp. O extrato da própolis vermelha demonstrou ação antimicrobiana mais eficiente e menores valores de MIC e MBC em comparação com o da verde, independentemente do tipo de extração utilizado na sua obtenção. A ação bactericida das própolis avaliadas neste estudo foi efetiva para inativar os isolados avaliados a 6,25 mg/mL (MBC) e para inibi-los a 3,1 mg/mL (MIC).

## REFERÊNCIAS

1. Bankova VS, Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin, *Apidologie*. 2000;31(1):3-15.
2. Russo A, Longo R, Vanella A. Antioxidant activity of propolis: role of caffeic acid phenethyl ester an galang. *Fitoterapia*. 2002;73(1):21-9.
3. Paulino MS. Produtos da colmeia. In: Souza DC, editor. *Apicultura: manual do agente de desenvolvimento rural*. Brasília: Sebrae. 2004. 187 p.
4. Sforcin JM, Fernandes A Jr, Lopes CAM, Bankova V, Funari, SRC. Seasonal effect on Brazilian propolis antibacterial activity. *J Ethnopharmacol*. 2000;73(1-2):243-9.
5. Castro ML, Cury JA, Rosalen PL. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. *Quim Nova*. 2007;30(7):1512-16.
6. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis. *Food Chem Toxicol*. 1998;36(4):347-63.
7. Pereira A dos S, Seixas FRMS, Neto FR de A. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quím Nova*. 2002;25(2):321-6.
8. Lima IO, Oliveira RAG, Lima EO, Farias NMP, Souza EL. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. *Braz J Pharmacog*. 2006;16(2):197-201.
9. Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Neto JR. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. *Braz J Pharmaco*. 2008;18(3):447-54.
10. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie*. 1995;26:83-9.
11. Teixeira EW, Negri G, Meira RMSA, Message D, Salatino A. Plant origin of Green propolis: bee behavior, plant anatomy and chemistry. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2005;2(1):85-92.
12. Simone-Finström M, Spivak M. Propolis and bee health: the natural history and significance of resin use by honey bees. *Apidologie*. 2010;41(3):295-311.
13. Cottica SM, Sawaya ACHF, Eberlin MN, Franco SL, Zeoula LM, Visentainer JV. Antioxidant Activity and Composition of Propolis Obtained by Different Methods of Extraction. *J Braz Chem Soc*. 2011;22(5):929-35.
14. Cuesta-Rubio O, Piccinelli AL, Rastrelli L. Tropical Propolis: Recent Advances in Chemical Components and Botanical Origin. In: Rastrelli L. *Propolis tropical*. Science Publishers: Taylor & Francis Group, LLC. p. 209-40, 2012.
15. De Souza GG, Pfenning LH, De Moura F, Salgado M, Takahashi JA. Isolation, identification and antimicrobial activity of propolis-associated fungi. *Nat Prod Res*. 2013;27(18):1705-7.
16. Ortega NS, Campo NB, Cabezas-Fajardo FA. Actividad antibacteriana y composición cualitativa de propoleos provenientes de zonas climáticas del Departamento del Cauca. *Artículos de Investigación Científica y Tecnológica*. 2011;9(1):8-16.
17. Tiveron AP, Rosalen, PL, Franchin M, Lacerda RCC, Bueno-Silva B, Benso B, Denny C, Ikegaki M, De Alencar SM. Chemical Characterization and Antioxidant, Antimicrobial, and Anti-Inflammatory Activities of South Brazilian Organic Propolis. *PLoS One*. 2016;11(11):1-18.
18. Almeida ET da C, Silva MCD da, Oliveira LM dos S, Kamiya RU, Arruda RE dos S, Vieira DA, Silva V da C, Escodro PB, Basílio-Júnior ID, Nascimento TG do. Chemical and microbiological characterization of tinctures and microcapsules loaded with Brazilian red propolis extract. *J Pharm Anal*. 2017;7(5):280-7.

19. Bastos EMAF, Galbiati C, Loureiro EM, Scoaris DO. Indicadores físico-químicos e atividade antibacteriana de própolis marrom frente à *Escherichia coli*. Arq Bras Med Vet Zootec. 2011;63(5):1255-9.
20. Alencar SM de, Aguiar CL de, Paredes-Guzmán J, Park YK. Composição química de *Baccharis dracunculifolia*, fonte botânica das própolis dos estados de São Paulo e Minas Gerais. Ciên Rur. 2005;35(4):909-15.
21. Sforcin JM, Bankova V. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? J Ethnopharmacol. 2011;27(2):253-60.
22. ampos JF, Santos UP dos, Macorini LFB, Melo AMMF de, Balestieri JBP, Paredes-Gamero EJ, Cardoso CAL, Souza K de P, Santos EL dos. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). Food Chem Toxicol. 2014;65:374-80.
23. Magalhães EO, de Carvalho JCAS, Borges IL, Almeida CP. Própolis: Estudo da origem do exsudado resinoso vermelho no caule de *Dalbergia ecastophyllum*. Mensagem Doce. 2011;110. [acesso 22 out 2019] Disponível em: <https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/110/artigo5.htm>.
24. Saeki EK, Peixoto ECT de M, Matsumoto LS, Marcusso PF, Monteiro RM. Mastite bovina por *Staphylococcus aureus*: Sensibilidade às drogas antimicrobianas e ao extrato alcoólico de própolis. Acta Vet Bras. 2011;5(3):284-90.
25. Peixoto ECTM, Jardim JG, Heinzen EL, Domingues PF, Padovani CR, Orsi R de O. Própolis no controle da mastite bovina. Arch Vet Sci. 2012;17(4):43-52.
26. Troncarelli MZ, Brandão H de M, Gern JC, Guimarães A de S, Langoni H. Mastite bovina sob nanocontrole: a própolis nano estruturada como nova perspectiva de tratamento para rebanhos leiteiros orgânicos. Vet Zootec. 2013;20:124-36.
27. Pinto MS, Faria JE, Message D, Cassini STA, Pereira CS, Gioso MM. Efeito de extratos de própolis verde sobre bactérias patogênicas isoladas de leite de vacas com mastite. Braz J Vet Res Anim Sci. 2001;38(6):278-83.
28. Bankova V, Boudourova-Krasteva G, Sforcin JM, Frete X, Kujumgiev A, Maimoni-Rodella R. Phytochemical evidence for the plant origin of Brazilian propolis from São Paulo State. Zeitschrift fur Naturforschung - Sec C J Biosci. 1999;54(5-6):401-5.
29. Ghisalberti EL. Propolis: A Review. Bee World. 1979;60(2):59-84.
30. Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Costa MM, Silva MS, Viana LR. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. Ciên Rur. 2004;34(1):159-63.
31. Júnior AF, Lopes MMR, Colombari V, Monteiro ACM, Vieira EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. Ciên Rur. 2006;36(1):294-7.
32. Neves MVM Das, Silva TMS Da, Lima E De O, Cunha EVL Da, Oliveira E De J. Isoflavone formononetin from red propolis acts as a fungicide against *Candida* sp. Braz J Microbiol. 2016;47(1):159-66.
33. Andrade JKS, Denadai M, Oliveira CS De, 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;101:129-38.
34. Park YK, Ikegaki M, Alencar SM, Moura FF. Evaluation of Brazilian propolis by both physicochemical methods and biological activity. Honeybee Sci. 2000;21(2):85-90.
35. Dausch A, Moraes CS, Fort P, Pacheco E, Lima I.B, Abreu JA, Park YK. Própolis Vermelha e sua origem botânica. Mensagem Doce. 2006;89. [acesso 10 jul 2019] Disponível em: <http://apacame.org.br/mensagemdoce/89/artigo.htm>.
36. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, Alencar SM. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of Brazilian propolis. Evid Based Complement Alternat Med. 2008;5(3):313-6.

37. Alencar SM, Oldoni TLC, Castro ML, Cabral ISR, Costa-Neto CM, Cury JA, Rosalen PL, Ikegaki M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. *J Ethnopharmacol.* 2007;113(2):278-83.
38. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agr Food Chem.* 2002;50(9):2502-6.
39. Popova M, Bankova V, Butovska D, Petkov V, Nikolova-Damyanova B, Sabatini AG, Marcazzan GL, Bogdanov S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochem Anal.* 2004;15(4):235-40.
40. Park YK, Paredes-Guzman JF, Aguiar CL, Alencar SM, Fujiwara FY. Chemical Constituents in *Baccharis dracunculifolia* as the Main Botanical Origin of Southeastern Brazilian Propolis. *J Agr Food Chem.* 2004;52(5):1100-3.
41. Maróstica Junior MR, Dausch A, Moraes CS, Queiroga CL, Pastore GM, Parki YK. Comparison of volatile and polyphenolic compounds in Brazilian green propolis and its botanical origin *Baccharis dracunculifolia*. *Ciênc Tecnol Aliment.* 2008;28(1):178-81.
42. Coelho LGV, Bastos EMAF, Resende CC, Silva CMP, Sanches BSF, de Castro FJ, Moretzsohn LD, Vieira WL dos S, Trindade OR. Brazilian green propolis on *Helicobacter pylori* infection. a pilot clinical study. *Helicobacter.* 2007;12(5):572-4.
43. Valencia D, Alday E, Robles-Zepeda R, Garibay-Escobar A, Galvez-Ruiz JC, Salas-Reyes M, Jiménez-Estrada M, Velazquez-Contreras E, Hernandez J, Velazquez C. Seasonal effect on chemical composition and biological activities of Sonoran propolis. *Food Chem.* 2012;131(2):645-51.
44. Mutton MJR, Filho JH de O, Costa GHG, Roviero JP, Freita LA de. Green and brown propolis: efficient natural biocides for the control of bacterial contamination of alcoholic fermentation of distilled beverage. *Food Sci Technol.* 2014;34(4):767-72.
45. Dausch A, Moraes CS, Fort P, Park YK. Brazilian red propolis chemical composition and botanical origin. *Evid Bas Complement Alternat Med.* 2008;5(4):435-41.
46. Salatino A, Fernandes-Silva CC, Righi AA, Salatino ML. Propolis research and the chemistry of plant products. *Nat Prod Rep.* 2011; 28(5):925-36.
47. Cushnie TP, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. *Int J Antimicrob Agents.* 2005;26(5):343-56. Erratum in *Int J Antimicrob Agents.* 2006;27(2):181.
48. Taylor PW, Stapleton PD, Paul LJ. New ways to treat bacterial infections. *Drug Discov Today.* 2002;7(21):1086-91.
49. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep.* 2000;17(3):215-34.
50. Clardy J, Walsh C. Lessons from natural molecules. *Nature.* 2004;432(7019):829-37.
51. Franco SS, Rosa AP, Lengler S, Utt Patel R, Zanella I, Gressler C, Souza HM. Índices produtivos e rendimento de carcaça de frangos de corte alimentados com dietas contendo níveis de extrato etanólico de própolis ou promotores de crescimento convencionais. *Ciência Rural.* 2007;37:1765-71.
52. Hojo PA. Extração de compostos bioativos de própolis verde por alta pressão isostática [Dissertação]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos; 2017. 115p.
53. International Organization for Standardization. ISO 6579 Microbiology of the food chain - Horizontal method for the detection, enumeration and serotyping of *Salmonella*. Part 1: Detection of *Salmonella* spp. 1a ed. Geneva, Switzerland; 2017. 50 p.
54. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically (M100-S10 (M7)). Approved standard. 5<sup>a</sup>ed. Wayne, PA: NCCLS; 2000.

55. Koo H, Rosalen PL, Cury JA, Ambrosano GMB, Murata RM, Yatsuda R, et al. Effect of a New Variety of *Apis mellifera* Propolis on Mutants Streptococci. *Curr Microbiol.* 2000;41(3):192-6.
56. Corrêa FT. Ação antimicrobiana da própolis verde em microrganismos isolados e identificados na superfície de queijo tipo gorgonzola [Tese]. Lavras: Universidade Federal de Lavras; 2017. 58p.
57. Silva RPD, Machado BAS, Barreto GA, Costa SS, Andrade LN, Amaral RG, Carvalho AA, Padilha FF, Barbosa JD, Umsza-Guez MA. Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic properties of various Brazilian propolis extracts. *PLoS One.* 2017;12(3):1-18.
58. Pinheiro AO, Santiago LG, Gomes RS de S, Ferreira R de P, Sales MDC. Própolis: Uma potencial alternativa aos antibióticos. II Jornada de Iniciação Científica. III Seminário Científico da FACIG. 2017. 6p.
59. Machado BAS, Silva RPD, Barreto G de A, Costa SS, Silva DF da, Brandão HN, Rocha JLC da, Dellagostin OA, Henriques JAP, Umsza-Guez MA, Padilha FF. 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):1-26.
60. Righi AA, Alves TR, Negri G, Marques LM, Breyer H, Salatino A. Brazilian red propolis: unreported substances, antioxidant and antimicrobial activities. *J Sci Food Agric.* 2011;91(13):2363-70.
61. Przybyłek I, Karpinski TM. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules.* 2019;24(11):E2047.
62. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three diferente races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol.* 2005;99(1):69-73.
63. Cardoso RL, Maboni F, Machado G, Alves SH, Vargas AC de. Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase positive and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis. *VetMicrobiol.* 2010;142(3-4):432-4.
64. Hilliard JJ, Krause HM, Bernstein JI, Fernandez JA, Nguyen V, Ohemeng KA, Barrett JF. A comparison of active site binding of 4-quinolones and novel flavone gyrase inhibitors to DNA gyrase. *Adv Exp Med Biol.* 1995;390:59-69.
65. Bernard FX, Sablé S, Cameron B, Provost J, Desnottes JF, Crouzet J, Blanche F. Glycosylated flavones as selective inhibitors of topoisomerase IV. *Antimicrob Agents Chemother.* 1997;41(5):992-8.
66. Abubakar MB, Abdullah WZ, Sulaiman AS, Ang BS. Polyphenols as key players for the antileukaemic effects of propolis. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2014;1:1-11.
67. Koneman EW, Procop GW, Church DL, Hall GS, Janda WM, Schereckenberger PC, Woods GL. Diagnóstico microbiológico - Texto e Atlas Colorido. 7ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018. 1860 p.
68. Araújo MAR, Lobério SA, Guerra RNM, Ribeiro MNS, Nascimento RFR. Mechanisms of action underlying the anti-inflammatory and immunomodulatory effects of propolis: a brief review. *Rev Bras Farmacognosia.* 2012;22(1):208-19.
69. Silva RPD, Machado BAS, Costa SS, Barreto GA, Padilha FF, Umsza-Guez MA. Aplicação de Extrato de Própolis em Produtos Alimentícios: Uma Prospecção Baseada em Documentos de Patentes. *Rev Virtual Quim.* 2016;8(5):1251-61.
70. AL-Ani I, Zimmermann S, Reichling J, Wink M. Antimicrobial Activities of European Propolis Collected from Various Geographic Origins Alone and in Combination with Antibiotics. *Medicines.* 2018;5(2):1-17.

71. Kalia P, Kumar NR, Harjai K. Efficacy of diferente extracts of propolis against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; *In vitro* and *in vivo* study. J Appl Nat Sci. 2017;9(1):144-9.
72. Gomes MFF, Ítavo CCBF, Leal CRB, Ítavo CV, Linas RC. Atividade antibacteriana *in vitro* da própolis marrom. Pesq Vet Bras. 2016;36(4):279-82.
73. Nina N, Quispe C, Jiménez-Aspee F, Theoduloz C, Feresín GQ, Lima B, Leiva E, Schmeda-Hirschmann G. Antibacterial Activity, Antioxidant Effect and Chemical Composition of Propolis from teh Región del Maule, Central Chile. Molecules. 2015;20(10):18144-167.

## CAPÍTULO 4 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

Devido a importância do gênero *Salmonella* sp, a realização de estudos epidemiológicos sobre dispersão dos genes de virulência, potencial patogênico e perfil de resistência à antimicrobianos, fornecem informações importantes aos órgãos de saúde pública, subsidiando um maior entendimento dos sorovares circulantes e contribuindo para adoção de estratégias com o intuito de prevenir o surgimento e disseminação de cepas resistentes, resguardando a eficiência principalmente dos antimicrobianos criticamente importantes para saúde humana e animal.

Neste contexto, surgem a necessidade pela busca de métodos alternativos de controle como a própolis. Um material de origem natural que tem se tornado atraente, tanto no âmbito científico quanto econômico, devido à presença de compostos bioativos em sua composição. São necessários estudos complementares que avaliem a ação antimicrobiana da própolis frente a outros tipos de microrganismos Gram-negativos significativos na área da produção avícola. Extratos de própolis podem ser aplicados superficialmente por imersão dos alimentos diretamente neles ou revestimento com camadas especificamente desenvolvidas à base de polímeros contendo extratos de própolis. Ambos os métodos podem ser usados para reduzir ou eliminar completamente os patógenos que são transferidos nos alimentos ou para reduzir a microbiota saprófita nos alimentos, reduzindo deterioração.

Neste estudo, comprovou-se a atividade antimicrobiana dos extratos de própolis frente a isolados provenientes de produtos de origem avícola. O desenvolvimento de novas pesquisas é necessário para que se explore e esclareça as possíveis aplicações deste material. Somente assim será possível correlacionar o tipo de própolis com sua aplicação na indústria alimentícia. Encontrou-se neste estudo um bom potencial antimicrobiano para os extratos de própolis e, desta forma, estudos futuros poderão avaliar a possibilidade de sua utilização na indústria alimentícia, na constituição de embalagens inteligentes e / ou como agente antimicrobiano em plantéis, podendo ser incluso nas dietas das aves, utilizado como conservante em produtos destinados ao consumo humano ou até mesmo como agente sanitizante / desinfetante em superfícies abióticas com o objetivo de prevenir a formação de biofilmes. Cada vez mais pesquisas sobre a aplicação de própolis em alimentos se destacam e tendem a se tornarem frequentes frente ao amplo cenário de propriedades biológicas que este produto apresenta e as demandas de mercado frente à utilização de produtos naturais.