

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

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA PRÓPOLIS VERDE SOBRE**  
*Salmonella enterica subsp. enterica*

Layane Martins Maia

Orientador(a): Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Cíntia Silva Minafra e Rezende

GOIÂNIA

2020



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO (TECA) 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 9.610/98](#), o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou download, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

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

**1. Identificação do material bibliográfico**

Dissertação     Tese

**2. Nome completo do autor**

Layane Martins Maia

**3. Título do trabalho**

Potencial antimicrobiano da própolis verde sobre *Salmonella enterica* subsp. *enterica*

**4. Informações de acesso ao documento (este campo deve ser preenchido pelo orientador)**

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

[1] Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. Após esse período, a possível disponibilização ocorrerá apenas mediante:

- a) consulta ao(a) autor(a) e ao(a) orientador(a);
- b) novo Termo de Ciência e de Autorização (TECA) assinado e inserido no arquivo da tese ou dissertação.

O documento não será disponibilizado durante o período de embargo.

Casos de embargo:

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

**Obs. Este termo deverá ser assinado no SEI pelo orientador e pelo autor.**



Documento assinado eletronicamente por Cíntia Silva Minafra E Rezende, Professora do Magistério Superior, em 16/12/2020, às 13:39, 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 LAYANE MARTINS MAIA, Discente, em 16/12/2020, às 17:07, 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 1753059 e o código CRC C136FEAD.

LAYANE MARTINS MAIA

**POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA PRÓPOLIS VERDE SOBRE**  
*Salmonella enterica subsp. enterica*

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

**Área de concentração:**

Saúde Animal, Tecnologia e Segurança Alimentar.

**Linha de pesquisa:**

Segurança alimentar

**Orientadora:**

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

**Comitê de orientação:**

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

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Bruna Aparecida Souza Machado – Centro  
Universitário SENAI CIMATEC – Bahia

GOIÂNIA

2020

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

Martins Maia, Layane

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DA PRÓPOLIS VERDE SOBRE  
Salmonella enterica subsp. enterica [manuscrito] / Layane Martins  
Maia. - 2020.

XLVIII, 48 f.: il.

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

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

Bibliografia.

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

1. Antibiograma. 2. Concentração bactericida mínima. 3. Concentração inibitória mínima. 4. Extratos. 5. Resistência. I. Silva Minafra e Rezende , Cíntia , orient. II. Título.

CDU 639.09



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

ESCOLA DE VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**

Ata nº 539 da sessão de Defesa de Dissertação de **Layane Martins Maia**, que confere o título de Mestre(a) em **Ciência Animal**, na área de concentração em **Saúde Animal, Tecnologia e Segurança de Alimentos**.

Aos **quatorze dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte**, a partir das **14h00min**, na sala 03 (auditório) da Pós-Graduação da EVZ/UFG, realizou-se a sessão pública de Defesa de Dissertação intitulada "**Potencial antimicrobiano da própolis verde sobre *Salmonella enterica* subsp. *enterica***". Os trabalhos foram instalados pela Orientadora, **Prof.ª Dr.ª Cíntia Silva Minafra e Rezende (EVZ/UFG)** com a participação dos demais membros da Banca Examinadora: **Prof. Dr. Weslen Fabricio Pires Teixeira (PPGCA/EVZ)**, membro titular interno; **Prof.ª Dr.ª Marília Cristina Sola (ICA/UFVJM)**, membro titular externo. Durante a arguição os membros da banca **não fizeram sugestão de alteração do título do trabalho**. A Banca Examinadora reuniu-se em sessão secreta a fim de concluir o julgamento da Dissertação, tendo sido a candidata **aprovada** pelos seus membros. Proclamados os resultados pela **Prof.ª Dr.ª Cíntia 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 quatorze dias do mês de fevereiro de dois mil e vinte.

**TÍTULO SUGERIDO PELA BANCA**



Documento assinado eletronicamente por **Cíntia Silva Minafra E Rezende, Professora do Magistério Superior**, em 14/02/2020, às 15:52, 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 **Marília Cristina Sola, Usuário Externo**, em 14/02/2020, às 15:54, 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 14/02/2020, às 15:55, 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 **1155516** e o código CRC **73BBAA67**.

**Referência:** Processo nº 23070.003233/2020-98

SEI nº 1155516

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	3
2.1 Resistência antimicrobiana (RAM).....	3
2.1.1 Resistência antimicrobiana na saúde pública .....	5
2.1.2 Resistência antimicrobiana no setor agropecuário .....	5
2.2 Própolis como alternativa antimicrobiana.....	6
2.2.1 Própolis no Brasil .....	7
2.2.2 Características físico-químicas da própolis .....	9
2.2.3 Atividades biológicas .....	11
2.2.4 Métodos de extração .....	13
2.3 <i>Salmonella</i> spp. ....	13
2.3.1 <i>Salmonella</i> na avicultura de corte .....	15
2.3.2 Ocorrência de <i>Salmonella</i> spp. em carcaças de frango .....	16
2.3.3 Frequência de isolamento de <i>Salmonella</i> e seu comportamento quanto à ação dos antimicrobianos .....	18
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	21
4.1 Obtenção dos extratos .....	21
4.1.1 Determinação dos compostos fenólicos totais.....	21
4.1.2 Determinação do teor de flavonoides totais .....	21
4.1.3 Determinação da atividade antioxidante total pelo radical livre DPPH.....	22
4.2 Bactérias de coleções e isolados de <i>Salmonella</i> spp. ....	22
4.3 Suscetibilidade a antimicrobianos .....	25
5. RESULTADOS .....	27
6. DISCUSSÃO.....	32
7. CONCLUSÃO .....	37
REFERÊNCIAS .....	38

**LISTAS DE FIGURAS**

FIGURA 1 – Modelo de microplaca dos isolados *Salmonella* Schwarzengrund 1 e 2. As colunas de 2 a 11 correspondem respectivamente às seguintes diluições de cada extrato: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,8; 0,4; 0,2 e 0,1 mg/mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A coluna 12 representa o controle da solução de resazurina a 0,01% (presença do microrganismo sem adição do extrato da própolis).....25

FIGURA 2 - Frequência (%) de resistência antimicrobiana dos 30 isolados de origem avícola e ambiental. AMI: amicacina (30µg), CTF: ceftiofur (30µg), CRO: ceftriaxona (30µg), DOX: doxiciclina (30µg) e NOR: norfloxacina (100µg) ..... 30

**LISTAS DE QUADROS**

QUADRO 1 – Atividades biológicas da própolis. ....	11
QUADRO 2 – Extrato da própolis verde obtido por extração etanólica e ultrassônica. ....	21
QUADRO 3 – Cepas de <i>Salmonella</i> utilizadas e suas respectivas fontes. ....	22

**LISTAS DE TABELAS**

- TABELA 1 – Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais (mg EAG/g), flavonóides (mg EQ/g) e da atividade antioxidante por DPPH (%) de extratos de amostra obtida por extração etanólica (EtOH) e ultrassônica (US) .....27
- TABELA 2 – Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato da própolis verde obtido por extração etanólica e ultrassônica em concentrações variando de 0,1 a 100 mg/mL<sup>-1</sup> frente a cepas referência .....27
- TABELA 3 – Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato da própolis verde obtido por extração etanólica e ultrassônica em concentrações variando de 0,1 a 100 mg/mL<sup>-1</sup> frente em isolados de origem alimentar e ambiental.....28
- TABELA 4 – Perfil de suscetibilidade dos isolados de *Salmonella enterica* aos antimicrobianos .....29
- TABELA 5 – Perfis de resistência para os isolados de *Salmonella enterica* avaliados.....31

**LISTAS DE SIGLAS E ABREVIACÕES**

ANVISA	Agência de Vigilância Sanitária
APPCC	Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle
ATM	Antimicrobianos
APC	Antimicrobianos promotores de crescimento
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CBM	Concentração bactericida mínima
CIM	Concentração inibitória mínima
USDA	Departamento de Agricultura dos Estados Unidos
DVAs	Doenças veiculadas por alimentos
SIE	Inspeção Estadual
IN	Instrução Normativa
JETRO	<i>Japan External Trade Organization</i>
LPS	Lipopolissacarídeo
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
Saúde Única	<i>One Health</i>
ONU	Organização das Nações Unidas
FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura
OMS	Organização Mundial da Saúde
OIE	Organização Mundial de Saúde Animal
PNSA	Programa Nacional de Sanidade Avícola
RAM	Resistência aos antimicrobianos
SDA	Secretaria de Defesa Agropecuária
SIF	Serviço de Inspeção Federal
UV	Ultravioleta

## RESUMO

Ao longo dos anos, diversos microrganismos adaptaram-se e adquiriram resistência aos fármacos. A resistência aos antimicrobianos é considerada um problema global para os sistemas de saúde, no âmbito humano e animal. *Salmonella* consta como um dos patógenos de veiculação alimentar de grande impacto para a saúde pública. A ocorrência de isolados com perfis de multirresistência é real em todos os continentes e métodos alternativos devem ser investigados. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano de extratos de própolis verde sobre *Salmonella enterica*, bem como determinar o teor de compostos bioativos e perfil de sensibilidade a antimicrobianos convencionais no uso terapêutico. A própolis foi submetida a dois tipos de extração, etanólica e ultrassônica, decorrendo em extratos de igual terminologia. Foram quantificados os compostos fenólicos totais, teor de flavonoides totais e atividade antioxidante total pelo radical livre DPPH. Estes extratos foram diluídos em etanol nas concentrações: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,8; 0,4; 0,2 e 0,1 mg/mL<sup>-1</sup>. Duas cepas referenciais e 30 isolados do gênero *Salmonella* procedentes de alimento avícola e do ambiente subsidiaram os ensaios de viabilidade celular pelo método de microdiluição. Analisou-se o perfil de suscetibilidade de todas as cepas para amicacina (30µg), norfloxacina (10µg), ceftriaxona (30µg), ceftiofur (30µg) e doxiciclina (30µg), pelo método de disco-difusão. Os resultados evidenciaram que os isolados de campo apresentaram resistência cruzada e múltipla, sendo que 83,3% (25/30) das amostras foram resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos utilizados, apenas cinco isolados não apresentaram resistência e 21 isolados foram multirresistentes. A resistência cruzada ocorreu em 63,3% (19/30) dos isolados frente as cefalosporinas. Em relação à ação do extrato etanólico de própolis verde, identificou-se que para os sorotipos Agona, Anatum, Cerro, Saintpaul e todas as estirpes de Schwarzengrund apresentaram respostas igualitárias quanto à concentração inibitória mínima. Para os sorovar Heidelberg observou-se variabilidade para CIM, encontrando-se concentrações de 6,25 a 25 mg/mL<sup>-1</sup> bem como para a concentração bactericida mínima com variações entre 50 e 100 mg/mL<sup>-1</sup>. Para o extrato ultrassônico de própolis verde à CIM apresentou respostas iguais para os sorotipos Agona, Cerro e Saintpaul. Para o sorovar Heidelberg ocorreu variação para CIM entre 6,25 a 25 mg/mL<sup>-1</sup>, para o sorovar Schwarzengrund ocorreu variação entre 6,25 a 12,5 mg/mL<sup>-1</sup>. Conclui-se que isolados de campo reforçam o alerta sobre cepas multirresistentes para bases antimicrobianas eleitas para uso terapêutico no contexto da saúde animal e humana. Os extratos de própolis verde, por suas concentrações de compostos fenólicos/ flavonoides e seus componentes antioxidantes, apresentaram ação biológica antimicrobiana que inibiram, em concentrações variadas, sorotipos de *Salmonella enterica* oriundos do ambiente avícola. Por tais observações, pode-se considerar ambos extratos de própolis verde como alternativa dose-dependente à inibição de *Salmonella*.

**Palavras-chave:** Antibiograma, concentração bactericida mínima, concentração inibitória mínima, extratos, resistência.

## ABSTRACT

Over the years, several microorganisms have adapted and bought resistance to drugs. Antimicrobial resistance is considered a global problem for health systems, with no human and animal scope. *Salmonella* consumes as one of the foodborne pathogens of great impact on public health. The occurrence of episodes with multidrug resistance is real on all continents and alternative methods should be investigated. In this context, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of green propolis extracts on *Salmonella enterica*, as well as to determine the content of bioactive compounds and the sensitivity profile to antimicrobials used in therapeutic use. A propolis was subjected to two types of extraction, ethanolic and ultrasonic, resulting from equal extractions of terminology. Total phenolic compounds, total flavonoid content and total antioxidant activity were quantified by the free radical DPPH. These extracts were diluted in ethanol in the applications: 100; 50; 25; 12.5; 6.25; 3.125; 1.56; 0.8; 0.4; 0.2 and 0.1 mg / mL<sup>-1</sup>. Two reference strains and 30 species of *Salmonella* genus processed by agricultural food and environment subsidized by cell viability tests using the microdilution method. Analyze the susceptibility profile of all strains for amikacin (30µg), norfloxacin (10µg), ceftriaxone (30µg), ceftiofur (30µg) and doxycycline (30µg), using the disk-diffusion method. The results showed those that presented a studied and crossed resistance field, and 83.3% (25/30) of the samples were resistant to one or more antimicrobial agents used, only five times without resistance and 21 caused by multiresistants. Cross resistance occurred in 63.3% (19/30) of individuals facing cephalosporins. Regarding the action of ethanol extraction of green propolis, it was identified that the serotypes Agona, Anatum, Cerro, Saintpaul and all as strains of Schwarzengrund are the same or equal responses to minimal inhibition. To serovar, Heidelberg reduced the variability for MIC, using 6.25 to 25 mg / mL<sup>-1</sup>, as well as for the minimum bactericidal concentration with variations between 50 and 100 mg / mL<sup>-1</sup>. To extract ultrasound of green propolis from CIM, it presents equal responses for serotypes Agona, Cerro and Saintpaul. For Heidelberg serovar there was a variation for MIC between 6.25 to 25 mg / mL<sup>-1</sup>, for Schwarzengrund serovar there was a variation between 6.25 to 12.5 mg / mL<sup>-1</sup>. It is concluded that field isolates reinforce the alert about multidrug-resistant strains for antimicrobial bases chosen for therapeutic use in the context of animal and human health. The extracts of green propolis, due to their concentration of phenolic / flavonoid compounds and their antioxidant components, showed biological antimicrobial action that inhibited, in varying concentrations, *Salmonella enterica* serotypes from the poultry environment. For these observations, both extracts of green propolis can be considered as a dose-dependent alternative to *Salmonella* inhibition.

**Keywords:** Antibiogram, minimum bactericidal concentration, minimum inhibitory concentration, extracts, resistance.

## 1. INTRODUÇÃO

Pode-se definir antimicrobianos (ATM), como substâncias de origem natural, semissintética ou sintética que têm por objetivo inibir a multiplicação ou eliminar microrganismos, causando pouco ou nenhum dano ao hospedeiro<sup>1</sup>. A utilização dos ATM, com o intuito de curar várias doenças, levou ao aumento da expectativa e qualidade de vida da população, porém, com o passar do tempo, alguns microrganismos desenvolveram resistência a ação de determinados ATM<sup>2</sup>.

A preocupação com o aumento da resistência aos antimicrobianos (RAM) é mundial e abrange tanto a medicina humana quanto a animal, devido a utilização indiscriminada de ATM para profilaxia, tratamentos inadequados prescritos para humanos e automedicação, bem como, para melhorar os índices zootécnicos dos animais de produção, contribuindo assim para o surgimento de microrganismos multirresistentes<sup>3</sup>. A solução do problema será possível apenas com uma abordagem de Saúde Única (*One Health*), ou seja, na interface humano-animal-ambiente<sup>4</sup> e seu principal objetivo é que os ATM sejam usados com prudência em medicina humana e veterinária para preservar a sua eficácia e evitar a multirresistência<sup>5</sup>.

Durante muito tempo os ATM foram adicionados às dietas de animais criados para a produção de carne em níveis subterapêuticos, levando a uma melhoria significativa da eficiência alimentar<sup>6</sup>. Porém, o uso prolongado na produção de alimentos de origem animal contribuiu para o surgimento da resistência bacteriana a diferentes ATM<sup>7</sup>. Dessa forma, como esses animais são destinados ao consumo humano, essas bactérias e seus genes de resistência podem ser transmitidas e incorporadas à microbiota humana, reduzindo a eficácia dos ATM<sup>8,9</sup>.

*Salmonella* spp. está entre os principais agentes responsáveis por doenças veiculadas por alimentos (DVAs) em diversos países, incluindo o Brasil<sup>10,11</sup>. O risco de infecções em humanos normalmente está associado com o consumo de alimentos de origem animal contaminados, sendo a carne de frango e seus derivados, os principais envolvidos em surtos, no qual, *Salmonella enterica* é a espécie mais envolvida em DVAs em humanos e a mais frequentemente isolada em aves vivas e em carne de frangos<sup>12,13</sup>. Legislações e medidas de biossegurança são empregadas na indústria avícola, incluindo descarte das aves infectadas em granjas matrizes, porém, está associada a perdas econômicas para a avicultura, seja pela queda na produção ou por agravos a saúde pública<sup>14</sup>.

A emergência de cepas resistentes, dificulta os procedimentos clínicos, além de aumentar os custos do tratamento e das doenças na população humana<sup>15</sup>. Diversos países têm buscado alternativas viáveis para reduzir o uso de ATM na produção animal, com o objetivo de

restaurar e preservar a eficácia dos ATM no combate a doenças, propiciando benefícios à saúde humana<sup>16</sup>.

A própolis é uma mistura complexa formada por um material resinoso coletado de diversas fontes por abelhas melíferas<sup>17</sup>. Os extratos da própolis são obtidos por meio de técnicas convencionais, como a extração etanólica, extração aquosa ou por Soxhlet<sup>18,19,20</sup>, além da extração supercrítica e extração assistida por ultrassom, a qual é uma alternativa para obter compostos derivados de matrizes naturais<sup>21,22</sup>. Devido à grande biodiversidade do Brasil, diferentes propriedades biológicas e composições químicas são descritas para as amostras de própolis coletadas no país. Atualmente, a própolis brasileira pode ser classificada em 13 tipos diferentes, de acordo com suas propriedades físico-químicas e região onde foi coletada<sup>23</sup>.

Devido as diversas propriedades terapêuticas, a própolis vem se destacando, sendo a atividade antimicrobiana, uma das propriedades biológicas mais extensivamente estudada<sup>24</sup>. Isso se deve principalmente a efeitos relacionados a sua baixa toxicidade e a possibilidade de sua utilização como antimicrobiano alternativo à inibição de microrganismos resistentes à antibióticos, bem como por ser uma matriz natural<sup>25,26</sup>. A RAM é considerada um problema de saúde pública global, que mobiliza diversas organizações internacionais, indústrias, academia e governos, todos em prol de isolar e identificar novos compostos com atividades antimicrobianas<sup>27</sup> e os produtos naturais representam fontes valiosas para o desenvolvimento desses novos compostos<sup>28</sup>.

Atualmente, em várias partes do mundo, a própolis é comercializada pela indústria farmacêutica como composto da medicina alternativa, a qual é utilizada como complemento alimentar e/ou medicamento<sup>29</sup>. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi identificar e quantificar compostos bioativos de extratos da própolis verde obtidos por extração ultrassônica e etanólica e avaliar sua atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *Salmonella enterica* subespécie *enterica* de origem alimentar e ambiental.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Resistência antimicrobiana (RAM)

O uso irregular de ATM, acelerou o processo natural de resistência aos ATM, pois, no ambiente natural são produzidos por populações microbianas como forma de competição por recursos nutricionais e espaço dentro do micro-habitat que ocupam<sup>29</sup>. Além disso, o uso inadequado desses medicamentos, a baixa qualidade dos fármacos, uma rede laboratorial ineficiente, estratégias de prevenção e controle de infecções pouco eficientes, potencializam a RAM<sup>30</sup>. Essa resistência gera uma série de consequências que comprometem toda a população, como o prolongamento da doença, o aumento da taxa de mortalidade, a permanência prolongada no ambiente hospitalar e tratamentos preventivos ineficientes<sup>31</sup>.

A RAM é uma das principais ameaças a prevenção e tratamento eficazes de infecções causadas por microrganismos, causando impacto na saúde da população. Os microrganismos resistentes estão presentes entre os seres humanos e os animais por meio da alimentação, da água e do meio ambiente, sendo que sua transmissão está diretamente ligada ao comércio, viagens e migração humana e/ou animal. Sendo assim, a abordagem multisetorial no combate à resistência é mais eficaz do que ações focadas apenas na área de saúde humana<sup>32</sup>.

Número crescente de governos em todo o mundo estão dedicando esforços a um problema tão sério que ameaça a evolução da medicina moderna<sup>33</sup>. A RAM é amplamente discutida no contexto mundial em diversos fóruns, como na Organização Mundial da Saúde (OMS), na Organização Mundial de Saúde Animal (OIE), na Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), na Comissão do *Codex Alimentarius* e na Assembleia Geral da Organização das Nações Unidas (ONU), onde levam em consideração a *One Health* (Saúde Única), trabalhando em conjunto a saúde humana, animal e ambiental<sup>34</sup>.

A abordagem da Saúde Única consiste em uma estratégia mundial criada pela OIE, no início dos anos 2000, para a colaboração interdisciplinar e global entre os organismos relacionados com a saúde das pessoas e dos animais. O conceito de Saúde Única baseia-se na aplicação de práticas relacionadas à prevenção, à vigilância e à detecção das zoonoses, assim como à notificação dessas situações e à determinação de respostas eficazes e oportunas. O conceito também engloba aplicações relacionadas à inocuidade dos alimentos e à segurança alimentar. Mesmo sendo uma abordagem elencada para a saúde animal, tem impacto direto na saúde humana e no meio ambiente<sup>32</sup>.

Em 2015, os Estados membro da OMS endossaram o “Plano de Ação Global para o Enfrentamento à Resistência aos Antimicrobianos”, organizado em parceria com a FAO e a

OIE. O principal objetivo deste documento foi garantir a continuidade da capacidade de tratar e prevenir doenças infecciosas com medicamentos eficazes, seguros e de qualidade, utilizados de forma responsável e acessíveis a todos que deles necessitem<sup>30</sup>. Esse plano fornece ampla orientação para a elaboração dos planos nacionais dos países signatários, que se comprometeram a apresentá-los em maio de 2017, para enfrentamento do problema no período de cinco a dez anos<sup>31</sup>.

O plano global elencou cinco eixos estratégicos de atuação que visam ampliar o estado de atenção e promover mais conhecimento sobre a RAM, fortalecer a vigilância epidemiológica, reduzir a incidência de infecções, otimizar o uso de medicamentos antimicrobianos na saúde humana e animal e garantir investimento sustentável para sua implementação<sup>31</sup>.

O Brasil, como país membro da OMS, apoiou a adoção de metas graduais de implementação dos planos nacionais e a priorização das ações de acesso a medicamentos como estratégia fundamental para assegurar a abordagem integral e efetiva do problema<sup>35</sup>. O Ministério da Saúde (MS) coordenou diversas reuniões e formou um comitê com o objetivo de definir o Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos com o apoio da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA)<sup>31</sup>.

Destaca-se ainda que, antes mesmo do Plano Global, em 2005 no Brasil, o MS e a ANVISA, em parceria com a OPAS, estabeleceram a “Rede Nacional de Monitoramento da Resistência Microbiana em Serviços de Saúde”, para melhorar a detecção, a prevenção e o controle da emergência de resistência nos serviços de saúde no país. Em 2011, a ANVISA regulamentou a venda de antibióticos para o controle da dispensação de ATM de uso humano<sup>31</sup>. Antes dessa resolução, já havia a exigência de prescrição de antibióticos, medida considerada eficaz pela OMS para o enfrentamento ao uso desnecessário desses medicamentos<sup>35</sup>.

Em relação à saúde animal, em 1969 o Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) foi responsável pela regulamentação do registro, da fabricação, do comércio e do uso de ATM em animais (Decreto-lei nº 467/1969)<sup>36</sup>. De acordo com a Instrução Normativa nº 65/2006, o MAPA regulamentou também a utilização de produtos de uso veterinário ATM para alimentação animal<sup>37</sup>. Através do Plano Global, em maio de 2015, a Comissão sobre Prevenção da Resistência aos Antimicrobianos em Animais (CPRA), no âmbito da Secretaria de Defesa Agropecuária (SDA/MAPA), em conjunto com a Secretaria de Inovação, Desenvolvimento Rural e Irrigação (SDI/MAPA), elaborou o Plano de Ação Nacional para Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos (PAN-BR), para ser executado em cinco anos (2018 a 2022). Assim, o objetivo geral foi o de tentar garantir que se

mantenha a capacidade de tratar e prevenir doenças infecciosas com medicamentos seguros e eficazes, que sejam de qualidade assegurada e que sejam utilizados de forma responsável e acessível a todos que deles necessitem<sup>38</sup>.

### 2.1.1 Resistência antimicrobiana na saúde pública

O uso indevido e excessivo de ATM, na maior parte sem supervisão profissional, favorece o surgimento de resistência, sendo muito comum o uso de forma indiscriminada por indivíduos com infecções virais, como gripes e resfriados<sup>35</sup>. Além disso, os microrganismos que transportam genes de resistência se disseminam diretamente ou indiretamente por meio da contaminação dos esgotos, dos alimentos, da água e do meio ambiente<sup>39</sup>.

Cerca de 700.000 pessoas morrem a cada ano devido a cepas resistentes causadoras de infecções bacterianas comuns, e possivelmente, este número é subestimado devido a subnotificações e ações de vigilância menos eficientes<sup>40</sup>. Ressalta-se que a RAM representa alto risco à qualidade de vida humana, o que compromete o orçamento dos sistemas de saúde, sejam eles públicos ou privados, além de intensificar as infecções hospitalares<sup>29</sup>.

Este tipo de infecção pode estar ligada a falhas de biossegurança, como a utilização de equipamentos de proteção individual, lavagem das mãos, técnicas de assepsia, ineficiência dos controles microbiológicos e de vigilância de pacientes sob suspeita ou risco de infecção causada por patógenos resistentes, o isolamento inadequado de pacientes, serviço de atenção farmacêutica deficiente em relação a orientações sobre a patologia e a prescrição do fármaco, sua concentração, forma de uso, duração do tratamento e armazenamento do medicamento<sup>41</sup>.

Outros fatores de natureza socioeconômica que influenciam no uso não racional e abusivo desses medicamentos, são o nível social e acesso inadequado a estes fármacos, que consomem produtos de qualidade duvidosa, adulterados, falsificados ou contendo concentrações menores do princípio ativo<sup>42</sup>. Pacientes com infecções causadas por microrganismos resistentes apresentam alto risco de pior desfecho clínico ou morte, consumindo mais recursos em cuidados de saúde do que pacientes infectados com cepas não resistentes de uma mesma bactéria<sup>35</sup>.

### 2.1.2 Resistência antimicrobiana no setor agropecuário

O uso de ATM na agricultura, pecuária e piscicultura para prevenção e tratamento também causa impacto negativo à saúde pública, por selecionar cepas resistentes que podem ser transmitidas e incorporadas à microbiota humana e transferir genes de resistência aos patógenos e comensais humanos que podem se tornar patógenos oportunistas, reduzindo assim

a eficácia dos ATM<sup>43</sup>. Os desafios para seu uso racional são no sentido de efetivamente aumentar a supervisão veterinária respeitando a real necessidade, a dosagem prescrita, a duração do tratamento e o período de retirada, bem como a aquisição<sup>44</sup>.

A utilização dos ATM em animais tem como principais objetivos visar a promoção de crescimento e o controle de doenças infecciosas. Além disso, são utilizados para proteção do bem-estar animal, prevenção da propagação epidêmica de doenças infecciosas, prevenção da transferência de zoonoses de animais aos seres humanos, segurança dos produtos de origem animal e prevenção de doenças de origem alimentar. As práticas incorretas do uso de ATM em animais acarretam em concentrações de resíduos no ambiente, na carne e derivados desses animais e contribui para a RAM ativa, e consequente disseminação de genes de resistência<sup>45</sup>.

Aves, suínos e bovinos, são criados, muitas vezes, de maneira intensiva, com alta densidade populacional, o que favorece rápida disseminação de patógenos, sendo necessário o uso de ATM<sup>46</sup>. Entre 2010 e 2030, estima-se que o consumo global de ATM utilizados para animais de produção aumentará em 67% e, para os países como Brasil, Rússia, Índia, China e África do Sul, o aumento poderá ser de até 99%<sup>47</sup>.

## **2.2 Própolis como alternativa antimicrobiana**

Em várias partes do mundo, a própolis é comercializada pela indústria farmacêutica como componente da medicina alternativa<sup>29</sup>, sendo utilizada como complemento alimentar e medicamento<sup>30</sup>. Desde a década de 1980, este produto vem sendo largamente utilizado em suplementos alimentares e beberagens, como preventivo de infecções<sup>48</sup> e em aplicações tópicas<sup>49</sup>. O interesse global de pesquisas na própolis tem duas justificativas principais: a primeira devido a suas características de panaceia, ou seja, a capacidade que a própolis tem de possuir inúmeras atividades biológicas simultaneamente e a segunda devido ao seu alto valor agregado<sup>50</sup>.

A própolis é composta por diversas substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas, de consistência viscosa, recolhida de certas partes dos vegetais, como brotos e cascas de árvores ou de outras partes do tecido vegetal, por abelhas, que a transportam até a colmeia, onde adicionam e modificam sua composição, através de secreções próprias como a cera e secreções salivares essenciais, ou, ainda, resultante do processo de digestão do pólen pelas próprias abelhas<sup>51</sup>.

Essa substância é conhecida e utilizada desde os tempos mais remotos. Era bastante conhecida pelos sacerdotes do antigo Egito, que a utilizavam como substância medicinal e como

parte integrante dos unguentos e cremes de embalsamar. Mais tarde, persas, romanos e incas também fizeram uso da própolis para tratar infecções<sup>50</sup>. Também era conhecida dos Antigos Gregos, que originou o termo *própolis*, onde *pro* significa “em defesa” e *polis*, que quer dizer “cidade”<sup>52</sup>, pois, a própolis pode ser observada na entrada da colmeia<sup>51</sup>.

Os primeiros estudos sobre a origem da própolis ocorreram no início do século XX. No ano de 1908 surgiu o primeiro trabalho científico sobre suas propriedades e composição química<sup>53</sup> e em 1927, foi comprovado a origem vegetal da própolis de diversas variedades de plantas<sup>54</sup>. Já o primeiro estudo que avaliou a atividade biológica da própolis foi realizado no Instituto de Veterinária de Kazan (URSS), em 1947, investigando suas propriedades curativas e antimicrobianas<sup>55</sup>. No Brasil, a primeira publicação sobre a própolis, em 1984, apresentou estudo comparativo do efeito da própolis e antibióticos na inibição de *Staphylococcus aureus*. A própolis brasileira estudada apresentou mais atividade do que vários antibióticos testados<sup>50</sup>.

A própolis constitui-se de um material de construção, reparação, isolamento e proteção que as abelhas utilizam na colmeia para diversos fins, como por exemplo, vedar rachaduras, protegê-las contra insetos e microrganismos, permitir o melhor isolamento térmico possível, no preparo de locais assépticos para a postura da abelha rainha e na mumificação de insetos invasores<sup>51</sup>. É comum encontrar na colmeia pequenos animais ou parte deles envoltos deste material, em perfeito estado de conservação<sup>56</sup>, já que há ação antimicrobiana, que se opõe a qualquer processo de decomposição<sup>57</sup>. Além disso, os constituintes voláteis da própolis diminuem a aeroflora no interior da colmeia<sup>58</sup>.

As abelhas encontradas no Brasil são geneticamente distintas das abelhas encontradas na Europa e na América do Norte. No Brasil houve uma extensiva hibridização entre as abelhas europeias (*Apis mellifera* e *Apis mellifera lingustica*) com as abelhas africanas (*Apis mellifera scutellata*). Atualmente, as abelhas *Apis mellifera* no Brasil são chamadas de africanizadas<sup>59</sup>.

### 2.2.1 Própolis no Brasil

Comercialmente, a própolis tem ocupado lugar de destaque no mercado nacional e internacional de produtos apícolas. Tal inserção se deve, essencialmente, às constatações das inúmeras atividades biológicas atribuídas aos seus constituintes químicos. Como consequência, observou-se aumento do valor agregado ao produto<sup>60</sup>, onde o extrato alcoólico da substância no Japão é vendido a U\$110 o frasco contendo 35 ml, de acordo com os dados da *Japan External Trade Organization* (JETRO)<sup>61</sup>.

O Brasil é o segundo maior exportador, ficando atrás somente da China<sup>62</sup> e o terceiro maior produtor mundial da própolis. As condições climáticas, geográficas e as características da vegetação favorecem esta produção que tem sua maior demanda voltada para o mercado japonês. De toda a própolis *in natura* consumida no Japão, cerca de 92% é de origem brasileira<sup>62</sup>. A produção estimada de própolis no Brasil gira em torno de 140 toneladas, sendo que, 100 toneladas são oriundas da própolis verde<sup>62</sup>.

Devido à grande biodiversidade do Brasil, ocorre uma variação da composição da própolis de acordo com a região geográfica, tipos distintos de própolis foram descritos no país<sup>63</sup>. Atualmente, a própolis brasileira pode ser classificada em 13 tipos, de acordo com suas propriedades químicas e a área geográfica em que foi encontrada<sup>23</sup>. Park et al.<sup>64</sup> classificaram as amostras de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil em 12 grupos, de acordo com a aparência e coloração dos extratos. Posteriormente, uma nova própolis foi encontrada em colmeias localizadas ao lado do litoral e manguezais no nordeste brasileiro e foi classificado como própolis do grupo 13. Esta própolis é chamada de própolis vermelha, com origem botânica de *Dalbergia ecastophyllum*<sup>65,66</sup>.

A própolis verde pertencente ao grupo 12, tem como principal fonte botânica a *Baccharis dracunculifolia*, mais conhecida como “alecrim-do-campo” ou “vassourinha”, é uma planta nativa muito abundante no sudeste do Brasil<sup>23,67</sup>. No Brasil é produzido em média 100 toneladas anuais de própolis verde e 90% dessa extração está em Minas Gerais, sendo que, dos 250 apicultores associados à Cooperativa Nacional de Apicultura (Conap), 95% deles são de Minas Gerais<sup>68</sup>. Na própolis verde já foram identificados mais de 200 compostos químicos e mesmo apresentando uma variação química em sua composição, todos apresentam o composto polifenólico Artepelin C como principal composto bioativo (ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico)<sup>69</sup>.

As exigências do mercado obrigaram o Brasil a estabelecer normas para definir padrões mínimos de qualidade para comercialização destes produtos. Tanto a própolis bruta quanto o extrato de própolis devem atender a algumas especificações, conforme Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA)<sup>70</sup>.

No Brasil, o “Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade do Extrato de Própolis”, presente na normativa nº. 03, de 19 de janeiro de 2001 do Ministério da Agricultura e Abastecimento, visa manter a qualidade do extrato alcoólico de própolis brasileiro e determinar os requisitos mínimos de qualidade destinada ao comércio nacional. Algumas dessas especificações consideram determinar características sensoriais como aroma, cor, sabor, aspecto, características físico-químicas como teor mínimo de extrato seco (11% m/v), teor

máximo de cera do extrato seco (1% m/m), teor mínimo de flavonoides (0,25% m/m) teor mínimo de compostos fenólicos (0,25% m/m), propriedades antioxidantes (máximo 22 segundos), não autorização de uso de aditivos, critérios macroscópicos e microscópicos, acondicionamento e rotulagem, dentre outros<sup>71</sup>.

### 2.2.2 Características físico-químicas da própolis

Geralmente, a própolis constitui-se como um material quebradiço quando frio e se torna dúctil e maleável quando aquecido. Sua remoção da pele humana é difícil, pois parece interagir fortemente com óleos e proteínas presentes na pele<sup>52</sup>. Seu ponto de fusão é variável entre 60°C a 70°C, sendo que, pode atingir em alguns casos, até 100 °C<sup>56</sup>. A coloração da própolis é dependente de sua procedência, podendo variar do marrom escuro passando a uma tonalidade esverdeada até o marrom avermelhado, dependendo da flora de origem e idade<sup>52,56</sup>. Além disso, possui aroma característico (balsâmico e resinoso), que pode variar de uma amostra para outra dependendo da origem botânica e sabor de suave balsâmico a forte, amargo e picante<sup>72</sup>.

Alguns solventes, tais como éter, etanol, acetona, tolueno e tricloroetileno, permitem a solubilização de muitos constituintes. A parte insolúvel é constituída de matéria orgânica, tecidos vegetais, grãos de pólen e outros. Os compostos solúveis da própolis são constituídos por materiais cerosos, bálsamos, óleos essenciais e derivados fenólicos<sup>71</sup>.

Apesar de possíveis diferenças na composição devido à fonte floral, a maioria das própolis tem praticamente a mesma natureza química, em geral a própolis é composta de 50% de resina e bálsamo (composta de flavonoides e ácidos fenólicos), 30% de cera, 10% de óleos essenciais e aromáticos, 5% de pólen e 5% de outros compostos orgânicos<sup>52</sup>. Considerada uma das misturas mais heterogêneas de fontes naturais, aproximadamente 420 constituintes já foram identificados e caracterizados em diferentes amostras de própolis<sup>73</sup>, dentre eles ácidos graxos e fenólicos, ésteres, ésteres fenólicos, flavonoides (flavonas, flavononas, flavonóis, di-hidroflavonóis, etc.), terpenos, esteroides, aldeídos e ácidos aromáticos, sesquiterpenos e naftaleno, vitaminas B1, B2, B6, E, C e minerais como, manganês, ferro, cálcio e alumínio também já foram identificados em amostras de própolis<sup>52,63</sup>.

Em termos de ação farmacológica, os principais constituintes da própolis são os compostos fenólicos. Existem diversas classes de compostos fenólicos que ocorrem de maneira universal nas plantas e que podem desempenhar importantes papéis na biologia dos animais. Como exemplos, podem-se citar os ácidos fenólicos, como os ácidos benzóicos, cafeico, cumárico e ferúlico, os flavonoides, como a apigenina, o canferol e a quercetina<sup>74</sup>.

Entre os compostos fenólicos, destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos. Sabe-se que a ingestão de flavonoides interfere em diversos processos fisiológicos, e auxilia na absorção e na ação de vitaminas, por atuar nos processos de cicatrização, como antioxidantes, além de apresentarem atividade antimicrobiana<sup>75</sup>. Pesquisas recentes sugerem que na própolis brasileira os ácidos fenólicos são bem mais abundantes que os flavonoides. Talvez seja essa particularidade um dos fatores responsáveis pela enorme preferência do mercado internacional em relação à própolis produzida no Brasil<sup>56,64,76</sup>.

Os flavonoides são quantitativa e qualitativamente um dos maiores grupos de produtos naturais conhecidos no mundo. São constituintes das células vegetais superiores, atuam em atividades regulatórias de vitaminas lipossolúveis e eliminam odores que servem como sinais bioquímicos para diversos organismos do meio ambiente<sup>55</sup>.

Os flavonoides geralmente encontram-se oxigenados e vasto número ocorre conjugado com açúcares, sendo que já foram descritos mais de 80 tipos diferentes de açúcares. A forma conjugada também é chamada de heterosídeo e quando o flavonoide não está ligado ao açúcar é denominado aglicona, genina ou forma livre<sup>77</sup>. As estruturas de flavonoides comumente encontrados em própolis são o canferol, a quercetina, a isorramnetina e a galangina são flavonóis; a apigenina, a luteolina, a crisina e a tectocrisina são exemplos de flavonas; a pinocembrina é uma flavanona e a pinobanksina é um diidroflavonol<sup>74</sup>.

Os flavonoides exercem diversas funções nas plantas, absorvem radiação eletromagnética na faixa do ultravioleta (UV) e do visível, assim apresentam um papel de defesa das plantas frente à radiação UV da luz solar. Além disso, conferem proteção contra insetos, bactérias, fungos e vírus, atividade antioxidante, controle da ação de hormônios vegetais e inibição de enzimas. Entretanto, os flavonoides também atuam em relacionamentos harmônicos entre plantas e insetos, atraindo e orientando esses animais até o néctar, contribuindo assim para a polinização<sup>74</sup>.

Os ácidos fenólicos estão inseridos no grupo dos compostos fenólicos e são divididos em três grupos. O primeiro é composto pelos ácidos benzóicos, que possuem sete átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>), considerados os ácidos fenólicos mais simples encontrados na natureza. O segundo é formado pelos ácidos cinâmicos, que possuem nove átomos de carbono (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>). Ambos constituídos por núcleo básico hidroxifenilpropenóico, sendo considerados os principais ácidos fenólicos encontrados. Entre esses últimos sobressaem os ácidos cafeicos, *p*-cumárico e ferúlico. O terceiro grupo é formado pelas cumarinas, que são derivadas do ácido cinâmico<sup>78</sup>. Na própolis brasileira, os ácidos fenólicos são mais abundantes que os flavonoides<sup>74</sup>.

Os ácidos fenólicos conferem propriedades antioxidantes para os alimentos e para o organismo, são indicados para o tratamento e prevenção do câncer, doenças cardiovasculares e outras doenças<sup>78</sup>. Os ésteres de ácidos fenólicos, como os cafeatos e ferulatos foram identificados por sua ação antibacteriana, antifúngica e antiviral<sup>56,79,80</sup>. O principal componente com maior atividade antibacteriana presente na própolis verde brasileira é o ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico (Artepelin C)<sup>63</sup>. O éster fenético do ácido cafeico (CAPE) inibe vários processos associados a carcinogênese, suprimindo o crescimento de várias linhagens de células cancerígenas humanas<sup>81</sup>, além disso, possui atividade anti-inflamatória<sup>82</sup> e vasorelaxante<sup>83</sup>.

### 2.2.3 Atividades biológicas

As atividades biológicas decorrem da composição química da própolis<sup>64</sup>. No QUADRO 1 estão as atividades biológicas da própolis já comprovadas.

QUADRO 1 – Atividades biológicas de diversas própolis

Atividades biológicas	Referências
Antimicrobiana	Ghisalberti <sup>51</sup> ; Park et al. <sup>57</sup> ; Marcucci <sup>63</sup> ; Ishida et al. <sup>84</sup> ; Tosi et al. <sup>85</sup> ; Santana et al. <sup>86</sup>
Anti-inflamatória	Marcucci <sup>63</sup> ; Borrelli et al. <sup>82</sup> ; Silva et al. <sup>87</sup> ; Conti et al. <sup>88</sup>
Cicatrizante	Ghisalberti <sup>51</sup> ; Park et al. <sup>57</sup>
Anticariogênica	Park et al. <sup>57</sup>
Antiulcerogênica	Barros et al. <sup>89</sup>
Antitumoral	Frezza et al. <sup>90</sup> ; Araújo et al. <sup>91</sup> ; Chan et al. <sup>92</sup>
Antiparasitária	Pontin <sup>93</sup> ; Gressler et al. <sup>94</sup>
Antioxidante	Oldoni et al. <sup>95</sup> ; Lopes <sup>96</sup> ; Lustosa et al. <sup>97</sup> ; Bankova <sup>98</sup>
Antifúngica	Lustosa et al. <sup>97</sup> ; Búfalo et al. <sup>99</sup>
Antiviral	Ramos et al. <sup>100</sup> ; Cueto et al. <sup>101</sup> ; Bankova et al. <sup>102</sup>
Anestésica	Marcucci <sup>17</sup>
Imunomoduladora	Fisher et al. <sup>103</sup> ; Batista et al. <sup>104</sup>
Anti-hipertensiva	Kubota et al. <sup>105</sup> ; Mishima et al. <sup>106</sup>
Redutora dos níveis de colesterol	Yu et al. <sup>107</sup>
Ansiolítica e antidepressiva	Reis et al. <sup>108</sup>

A caracterização destas atividades biológicas aliada com o crescente estímulo da utilização de produtos naturais, tem resultado no aumento da demanda de própolis e seus derivados, como extratos etanólicos, tabletes, cápsulas, sprays ou pomadas<sup>108</sup>. Além disso, o uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos tem levado à seleção de microrganismos patogênicos mutantes resistentes, o que torna o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e economicamente viável, como a própolis<sup>109</sup>. Os extratos de própolis também têm demonstrado potencializar o efeito bactericida quando associados a determinados antibióticos, o que permite a redução da dose clínica de determinados antibióticos, diminuindo assim a incidência de efeitos colaterais e ao mesmo tempo potencializar a antibioticoterapia no tratamento de infecções em que a resistência bacteriana se torna fator determinante<sup>17,110</sup>.

As abelhas secretam uma resina com poder antibiótico extraordinário que as defende contra qualquer ataque de microrganismos. Esse antibiótico natural não oferece capacidade de resistência por parte das bactérias, pois os constituintes possuem um padrão de absorção, distribuição e excreção que assegura os níveis bactericidas por tempo necessário até a cura<sup>111</sup>, além de ser uma mistura complexa, fazendo com que haja maiores dificuldades para adaptabilidade bacteriana<sup>112</sup>.

A atividade antimicrobiana da própolis têm sido uma das propriedades biológicas mais extensivamente estudada<sup>80</sup>. O mecanismo da atividade antimicrobiana da própolis é devido a inibição da divisão celular, pois, a própolis age na inibição da replicação do DNA e indiretamente na divisão celular<sup>17</sup>. Essa atividade é atribuída aos flavonoides, ácidos aromáticos e seus ésteres presentes na resina<sup>63</sup>. Em relação aos flavonoides, a flavanona pinocembrina, flavonol, galagina e o éster feniletil do ácido cafeico, atuam na inibição da RNA-polimerase bacteriana. Os flavonoides como kaempferol, quercetina, galangina e pinocembrina bem como, os ácidos cafeico, benzoico, cinâmico e clorogênico afetam a capacidade das camadas lipoproteicas dos microrganismos de trocar íons, realizar transporte ativo e combinar com substratos. Além disso, a quercetina eleva a permeabilidade da membrana dificultando o transporte, a síntese de ATP e a mobilidade<sup>113,114</sup>.

Outro mecanismo comprovado de ação da própolis em relação as bactérias é o efeito sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática aos íons, causando a dissipação do potencial de membrana, o que a caracteriza como substância ionófora. O gradiente eletroquímico de prótons através da membrana é essencial para a bactéria manter a síntese de ATP, o transporte por meio da membrana plasmática e a motilidade, o que contribui para a ação citotóxica da própolis, podendo ainda diminuir a resistência das células a outros compostos

antibacterianos, explicando a maior sensibilidade frente aos microrganismos Gram-positivos do que Gram-negativos<sup>115</sup>. Isso ocorre porque a parede celular dos microrganismos Gram-positivos é mais permeável, possibilitando que agentes externos alterem mais facilmente a membrana plasmática<sup>116</sup>.

Acentuada atividade da própolis principalmente contra bactérias Gram-positivas e ação limitada contra Gram-negativas já foram descritas. A menor ação nas Gram-negativas, ocorre devido às diferenças na constituição química da parede celular por ser mais complexa e possuir maior teor de fosfolipídios que as Gram-positivas<sup>63,117</sup>. A parede celular das bactérias Gram-positivas é mais espessa, possui várias camadas de glicopeptídeos, com proteínas e polissacarídeos inseridos. A parede celular das bactérias Gram-negativas é mais fina, porém mais complexa, pois, possui uma única camada de glicopeptídeos, uma membrana externa com constituição similar a membrana citoplasmática, e uma camada de lipopolissacarídeo (LPS) que são glicolipídios complexos que conferem resistência às bactérias<sup>116</sup>.

#### 2.2.4 Métodos de extração

A própolis comercializada e consumida é um extrato da própolis bruta, sendo que os componentes e os efeitos da própolis comercializada depende do tipo da própolis bruta e do método de produção de seu extrato<sup>118</sup>. De acordo com os diferentes tipos de processos utilizados ao redor do mundo para obtenção de extratos de própolis, o etanol é a principal escolha de solventes, devido à afinidade de suas características químicas com a matriz. Também é utilizado outros solventes como, éter etílico, água, metanol e clorofórmio que também podem ser usados para a extração de classes específicas de constituintes da própolis<sup>119</sup>.

Os extratos de própolis são obtidos por diferentes métodos de extração. Os extratos podem ser obtidos por meio de técnica convencional que utiliza etanol como solvente de extração, ou por método alternativo, como a extração supercrítica (ESC)<sup>120</sup>. Sabe-se que o método de extração influencia o extrato obtido e diferentes extratos da mesma amostra de própolis podem exibir propriedades diferentes. O rendimento e a seletividade de alguns compostos são diretamente afetados pelo método de extração<sup>121</sup>.

### 2.3 *Salmonella* spp.

Bactérias do gênero *Salmonella* estão amplamente distribuídas na natureza<sup>122</sup>. Estão presentes em várias espécies animais, principalmente nas aves e suínos, são bactérias patogênicas para humanos e muitas outras espécies animais<sup>123</sup>. São bastonetes Gram-negativos, anaeróbios facultativos, não formadores de esporos, possuem flagelos peritríquios para sua

locomoção, têm a capacidade de descarboxilação dos aminoácidos lisina e ornitina, reduzir nitratos a nitritos e utilização do citrato como única fonte de carbono, fermentam glicose e geralmente não fermentam a lactose ou o fazem lentamente, compondo o grupo mais complexo pertencente à família *Enterobacteriaceae*<sup>124</sup>.

O gênero possui duas espécies, *Salmonella enterica* e *Salmonella bongori* e mais de 2680 sorovares foram identificados até o momento<sup>10</sup>. Além da divisão de espécies a *S. enterica* é dividida em seis subespécies, *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica*. Cada subespécie possui diferentes sorovares, os pertencentes à *S. enterica* subsp. *enterica* são designados por um nome geralmente relacionado com o local geográfico do seu primeiro isolamento. Este nome é escrito em letras romanas normais (não em itálico) e a primeira letra em maiúsculo. Sorovares pertencentes às outras subespécies e a espécie *S. bongori* são designados por seus antígenos, somáticos (O), flagelares (H) e capsulares (Vi) seguidos do nome da subespécie. Entre as espécies, a subespécie *S. enterica* é a mais importante, pois, apresenta maior número de sorovares, sendo responsável por 99% dos isolados em humanos<sup>124</sup>.

Os antígenos de *Salmonella* spp. são diferenciados e identificados por meio de testes de imunoaglutinação com a utilização de antissoros, que são preparados em coelhos e sua apresentação comercial é em forma de plasma liofilizado<sup>125</sup>. Os antígenos O são designados através de números arábicos e caracterizam os sorogrupos de *Salmonella* spp., sendo comum a vários sorovares. O polissacarídeo do lipopolissacarídeo (LPS), presente na camada peptidoglicana, é o principal antígeno de superfície dessas bactérias e sua especificidade antigênica deve-se a unidades repetidas de açúcares (tri, tetra ou pentassacarídeos), quanto ao antígeno Vi, este está presente no sorotipo *Typhi*, *Paratyphi* e *Dublin*<sup>126</sup>.

Já os antígenos H ocorrem em duas fases (1 e 2) e são designados por letras minúsculas. A sua quantidade é bem maior do que as letras do alfabeto, por isso a letra z é utilizada com indicadores numéricos (z1, z2, z3). A diferenciação entre as fases 1 e 2 ocorre quando uma célula de *Salmonella* spp. possuidora de um determinado antígeno flagelar se multiplica e dá origem a um clone que expressa outro antígeno flagelar. Os antígenos de fase 1 (ou específica) caracterizam alguns sorovares e os de fase 2 são comuns a vários sorovares. Essa informação é bastante utilizada e muito importante para classificar *Salmonella* spp.<sup>127</sup>.

Em relação aos fatores intrínsecos de um alimento, a atividade de água (Aa) pode afetar o crescimento de *Salmonella*, sendo seu valor mínimo igual a 0,94 (Aa ótimo: 0,99). Esse microrganismo pode viver um ano ou mais em alimentos com baixa Aa, como chocolate,

pimenta e gelatina. Em relação ao pH, o valor mínimo para o crescimento é 3,8 e o máximo, 9,5, sendo o ótimo entre 7 e 7,5<sup>128</sup>.

As espécies de *Salmonella* possuem temperatura ótima de crescimento de 35 a 43°C, com intervalo de crescimento de 2°C a 54°C<sup>5</sup>. O crescimento da *Salmonella* pode ser evitado se o alimento for mantido sob refrigeração abaixo de 5°C. Alimentos quentes mantidos acima de 55°C já é uma temperatura segura, porém 63°C é a recomendada em regulamentações<sup>128</sup>. A habilidade de crescer em temperaturas abaixo de 7°C vai depender do sorovar envolvido. Cepas de *Salmonella* Typhimurium são capazes de crescer em temperaturas entre 5°C e 6°C e as de *Salmonella* Agona, abaixo de 6°C<sup>122</sup>. Os microrganismos desse gênero são resistentes à dessecação, ao congelamento e podem sobreviver por mais de nove meses em solos úmidos e protegidos da luz<sup>129</sup>.

O *habitat* natural das salmonelas pode ser dividido em três categorias: altamente adaptadas ao homem, incluindo *S. Typhi* e *S. Paratyphi* A, B e C, agentes da febre entérica (febres tifóide e paratifóide); altamente adaptadas aos animais, representadas por *S. Dublin* (bovinos), *S. Choleraesuis* e *S. Typhisuis* (suínos), *S. Abortusequi* (equinos), *S. Pullorum* e *S. Gallinarum* (aves), responsáveis pelo paratifo dos animais; e as salmonelas zoonóticas, responsáveis por quadro de gastroenterite ou por DVAs. Sua distribuição é mundial, sendo os alimentos os principais veículos de sua transmissão. São responsáveis por significantes índices de morbidade e mortalidade, tanto nos países emergentes quanto nos desenvolvidos, determinando pequenos e grandes surtos<sup>124</sup>.

Devido *Salmonella* ser encontrada no intestino de vários animais, sobreviver em ambientes diversos e ser facilmente disseminada, o risco de infecções em humanos geralmente está associado com o consumo de alimentos de origem animal contaminados como ovos, carnes e leite<sup>10</sup>. Frangos de corte são os principais reservatórios desta bactéria, podendo aumentar a contaminação durante as operações de abate<sup>12,130</sup>.

### 2.3.1 *Salmonella* na avicultura de corte

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), *Salmonella* spp. continua sendo o principal agente responsável por DVAs em diversos países, incluindo o Brasil<sup>10,11</sup>. A cada ano mais de 600 milhões de pessoas do mundo ficam doentes após consumirem alimentos contaminados, resultando em mais de 420 mil mortes<sup>10</sup>. Infecções causadas por *Salmonella* spp. correspondem por mais de 33% de todas as DVAs no Brasil de 2000 a 2017<sup>11</sup>. *Salmonella* está entre as quatro principais causas globais de doenças diarreicas em humanos<sup>10</sup>.

A avicultura brasileira é um importante segmento do agronegócio nacional, sendo o Brasil o maior exportador mundial de carne de frango. Vários fatores produtivos aliados com a qualidade, sanidade e sustentabilidade agregam valor ao produto final e conquistam cada vez mais mercados internacionais<sup>131</sup>. De acordo com o Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), o Brasil é o segundo produtor mundial de carne de frango, sendo superado pelos Estados Unidos<sup>132</sup>.

Mais de 150 mercados são importadores da carne de frango produzida no Brasil. Em média são quase 4 milhões de toneladas embarcadas anualmente, quase um terço de tudo o que se produz no país, sendo o terceiro maior produtor mundial de carne de frango, com mais de 12 milhões de toneladas anuais de carne de frango. Sendo assim, o controle da *Salmonella* spp. nas etapas de produção é de extrema importância, pois, a presença da bactéria na carne é parâmetro de qualidade e interfere na relação comercial entre os países, havendo devolução do produto exportado caso seja detectada a sua presença<sup>133</sup>.

De acordo com o aumento da produção e comercialização dos produtos avícolas, foi necessário, por parte dos órgãos competentes, amparar e estabelecer normas e regras para que a cadeia produtiva mantivesse rígidos padrões de qualidade, assegurando por consequência a qualidade do seu produto final<sup>134</sup>. Apesar de todas as legislações, o controle de *Salmonella* no setor avícola ainda representa um grande desafio, principalmente pela diversidade e emergência de novos sorovares, queda na produção e pela sua relação com a saúde pública<sup>135</sup>. O fator de maior dificuldade para o controle desta bactéria é a falta de sinais clínicos e de lesões, pois, as aves podem ser portadoras assintomáticas na maioria dos casos<sup>136</sup>.

### 2.3.2 Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango

A ocorrência e a frequência no Brasil de *Salmonella* spp. em carcaças de frango variam em relação às condições de manejo na criação e aos cuidados higiênicos nas operações de abate seguido da manipulação das carcaças<sup>137</sup>. As falhas nos procedimentos de higienização em indústrias de alimentos permitem que os resíduos aderidos aos equipamentos e superfícies transformem-se em potencial fonte de contaminação<sup>138</sup>.

Cardoso et al.<sup>139</sup> investigaram a ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos de abatedouros em São Paulo-SP, Brasil. Analisaram 609 amostras entre 2000 e 2010, sendo que, a presença de *Salmonella* spp. foi confirmada em 89 (14,6%) carcaças. *S. Enteritidis* (49,4%) foi o mais prevalente, seguida pelos sorovares *S. Albany* (15,7%), *S. Infantis* (11,2%), *S. Agona* (5,6%), *S. Tennessee* (4,5%), *S. Heidelberg* (3,4%), *Salmonella* spp. (3,4%), *S. Kentucky* (2,3%), *S. enterica* O:4,5 (2,3%), *S. Montevideo* (1,1%) e *S. Newport* (1,1%).

Baptista et al.<sup>140</sup> detectaram a presença *Salmonella* spp. em frangos vivos e carcaças de frango em matadouros do Estado do Rio de Janeiro. Foram coletadas 60 amostras cloacais de frangos vivos e 60 amostras de carcaça de seis matadouros sob Inspeção Estadual (SIE). Os resultados mostraram prevalência de *Salmonella* spp. de 1,66% (1/60) em amostras de suabe de cloaca e de 26,66% (16/60) em carcaças. No total, foram isolados sete sorotipos diferentes nas carcaças: Senftenberg (15%) o mais frequente, seguido por Mbandaka (8,3%), Schwarzengrund (3,3%), Cerro (3,3%), Ohio (3,3%), Minnesota (1,66%) e Tennessee (1,66%). Os resultados encontrados demonstram contaminação por *Salmonella* spp. no Estado do Rio de Janeiro, além da presença de vários sorotipos de *Salmonella* spp.

Von Ruckert et al.<sup>141</sup> avaliaram a presença de *Salmonella* spp. em swabs de superfícies de 135 carcaças de frangos, coletadas em cinco diferentes pontos do abate, chuveiro inicial, evisceração mecânica e evisceração manual, chuveiro final, pré-resfriamento e gotejamento. *Salmonella* spp. foi encontrada em todas as fases de abate. O aumento da frequência de *Salmonella* spp. ocorreu após o chuveiro de lavagem das carcaças, localizado entre a evisceração e o pré-resfriamento. Já a menor contaminação foi encontrada na saída do pré-resfriamento, devido à baixa temperatura e alta concentração de cloro na água, com frequências de 3,7% (metodologia convencional), 0% (PCR) e 16,7% (imunoanálise).

Borsoi et al.<sup>142</sup> analisaram 180 carcaças de frango oriundas de varejos da região nordeste do Rio Grande do Sul no período de fevereiro a novembro de 2004 e obtiveram um percentual de isolamento de *Salmonella* de 12,2%. Os sorovares e frequência de isolamento de *Salmonella* nas amostras foram: *S. Enteritidis* (31,81%), *S. Agona* (31,81%), *S. Rissen* (22,7%), *S. Heidelberg* (9,10%) e *S. Livingstone* (4,54%).

Lúcio et al.<sup>143</sup> tiveram como objetivo investigar a ocorrência de *Salmonella* spp. em fezes de frangos de corte localizados em municípios da região central do estado de Minas Gerais, Brasil. O estudo analisou 845 amostras de fezes de diferentes granjas de aves e mostraram que 213 amostras estavam contaminadas com *Salmonella*, e os sorotipos encontrados foram: *S. Minnesota*, *S. Sandiego*, *S. Schwarzengrund*, *S. Infantis*, *S. Hadar*, *S. enterica* subsp. *enterica* (O: 4.5), *S. Montevideu*, *S. Miami*, *S. Heidelberg*, *S. Cerro*, *S. Ndolo*, *S. Panamá*, *S. Anatum*, *S. Tennessee*, *S. Agona*, *S. Newport* e *S. Muenster*.

Moreira et al.<sup>144</sup> avaliaram um total de 363 carcaças de frangos abatidos em frigoríficos no estado de Goiás, a presença de *Salmonella* spp. foi constatada em 52 carcaças, ou seja, 14,32% amostras contaminadas. O sorovar predominante foi *Salmonella* Albany seguido por *Salmonella* Enteritidis, indicando risco à saúde coletiva e segurança alimentar dos produtos e subprodutos de frangos devido à associação destes sorovares aos surtos.

Boni et al.<sup>145</sup> pesquisaram a ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários de frangos de corte e em produtos de abatedouro na região central de Mato Grosso do Sul. Foram analisados 134 *swabs* de arrasto em aviários de frangos de corte localizados em cinco municípios e 123 amostras de carcaças de frango, vísceras e água de *chiller* provenientes do abatedouro, sendo que, 11,28% das 257 tinham presença de *Salmonella*, dos quais 1,95% provenientes do campo e 9,33% do abatedouro. Os sorovares encontrados foram: *S. Enteritidis* (1,16%), *S. Typhimurium* (1,94%), *S. Senftenberg* (0,77%), *S. Schwarzengrund* (4,28%), *S. Livingstone* (0,38%), *S. Corvallis* (1,55%) e *S. Enterica* com 1,16%.

### 2.3.3 Frequência de isolamento de *Salmonella* e seu comportamento quanto à ação dos antimicrobianos

Estudos foram realizados com o objetivo de verificar a resistência antimicrobiana do patógeno, frequência de isolamento de *Salmonella* e seu comportamento quanto à ação dos ATM identificados são realizados. Neste sentido, destacam-se pesquisas em que foram encontrados isolados de *Salmonella* spp. com elevadas taxas de resistência no Brasil<sup>146</sup>.

Cardoso et al.<sup>147</sup> avaliaram a susceptibilidade antimicrobiana de 80 isolados de *Salmonella* Enteritidis de carcaças de frango no Estado do Rio Grande do Sul, Brasil. O antibiograma apresentou 100% de resistência a colistina, novobiocina, eritromicina e tetraciclina. Tiveram resistência em diferentes níveis a canamicina (1,25%), enrofloxacina (3,75%), neomicina (3,75%), fosfomicina (20%), sulfonamida (86,25%) e nitrofurantoína (90%) e por outro lado não apresentaram resistência a ciprofloxacina, norfloxacina, gentamicina, polimixina B, sulfametrim e sulfazotrim.

Duarte et al.<sup>148</sup> avaliaram isolados de *Salmonella* em carcaças de frangos de corte quanto à resistência antimicrobiana. Dezenove isolados de *Salmonella* foram testados quanto à resistência antimicrobiana, e os resultados indicaram que 94,7% eram resistentes a pelo menos um agente antimicrobiano. A resistência à estreptomicina (73,7%), nitrofurantoína (52,3%), tetraciclina (31,6%) e ácido nalidíxico (21%) foram as prevalentes nas cepas de *Salmonella* testadas, sendo que, *Salmonella* Enteritidis foi o sorovar mais frequente.

Souza et al.<sup>149</sup> tiveram como objetivo a avaliação da susceptibilidade antimicrobiana de 212 cepas de *Salmonella* isoladas de pacientes e alimentos e 45% foram resistentes ao ácido nalidíxico. As estirpes resistentes ao ácido nalidíxico mostraram uma concentração inibitória mínima mais alta para a ciprofloxacina do que as estirpes sensíveis.

Pandini et al.<sup>146</sup> verificaram o perfil de resistência de diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. isolados em aviários de frango de corte. Foram 342 *swabs* de arrasto de granjas

avícolas do oeste do Paraná, sendo isoladas 39 amostras de *Salmonella* spp., o maior percentual de resistência foi à tetraciclina (30,8%), e o menor à gentamicina e cloranfenicol (2,6%).

Baptista et al.<sup>140</sup> detectaram a presença *Salmonella* spp. em frangos vivos e carcaças em abatedouros do Estado do Rio de Janeiro, identificaram os sorotipos e avaliaram a susceptibilidade antimicrobiana dessas cepas para fluoroquinolonas e betalactâmicos. Foram coletadas 60 amostras cloacais de frangos vivos e 60 amostras de carcaça de seis abatedouros sob Inspeção Estadual (SIE). Os isolados foram sorotipificados e testados frente a oito antimicrobianos pelo método de difusão em disco. Em relação à susceptibilidade antimicrobiana, 29 (87,87%) isolados foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados e 4 (12,12%) isolados foram resistentes a pelo menos três antimicrobianos betalactâmicos ou mais. Não foi observada resistência às fluoroquinolonas. A resistência encontrada para betalactâmicos alerta para a disseminação dessas cepas pela cadeia alimentar.

Brito et al.<sup>150</sup> determinaram o perfil de resistência antimicrobiana de 19 isolados de *Salmonella* spp.. Observaram que quatro isolados (21,05%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos e 15 (78,95%) apresentaram resistência no mínimo a dois antimicrobianos. Das quatro amostras sensíveis a todos os fármacos, três (75%) eram *S. Schwarzengrund* e uma (25%) *S. enterica* subsp O:4,5. Dois isolados (*S. Agona* e *S. Albany*) foram resistentes a cinco antimicrobianos. Enquanto que *S. Typhimurium* foi resistente a cefepime, ceftriaxona, ceftiofur e ceftaxima. Verificaram que 78,9% das amostras foram resistentes a ceftriaxona e ceftaxima.

Minharro et al.<sup>151</sup> estudaram carcaças e miúdos comestíveis (fígados e coração), em 60 lotes de aves abatidos no estado do Tocantins e avaliaram o perfil de resistência aos antimicrobianos. Foram isoladas 26 amostras indicativas de *Salmonella* spp. em 11 lotes (18,33%), sendo mais de uma estirpe por tipo de amostra. Foram testados 12 princípios farmacológicos, sendo a maioria sensível às tetraciclina, porém apresentaram 100% de resistência a um ou mais princípio ativo, principalmente para Sulfamethoxazole (30 mcg) e Amoxicilina/Ácido Clavulânico (30 mcg).

A sensibilidade de *Salmonella* spp. aos ATM depende diretamente do sorotipo, pois, possuem diversidade para o perfil de resistência entre diferentes sorotipos de *Salmonella* spp.<sup>145</sup>. A maioria dos sorotipos de *Salmonella* existentes podem ser patogênicos ao ser humano. Sendo assim, a sorotipificação e a avaliação do perfil de resistência antimicrobiana são importantes ferramentas para investigações epidemiológicas e para a criação de estratégias eficientes para o uso dos ATM<sup>151</sup>. O objetivo deste estudo foi avaliar in vitro o potencial antimicrobiano de extratos de própolis verde do Brasil, obtidos por métodos de extração etanólica e ultrassônica.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Identificar e quantificar compostos bioativos de extratos da própolis verde e avaliar sua atividade antimicrobiana *in vitro* sobre *Salmonella enterica* subespécie *enterica*.

#### 3.2 Objetivos específicos

- Quantificar compostos fenólicos e flavonoides dos extratos de própolis verde;
- Determinar a capacidade antioxidante dos extratos de própolis verde;
- Identificar a concentração inibitória mínima (CIM) dos extratos da própolis verde frente a isolados de *Salmonella* spp.;
- Identificar a concentração bactericida mínima (MBC) dos extratos da própolis verde frente a isolados de *Salmonella* spp.;
- Avaliar a melhor resposta de inibição de extrato/ sorotipo;
- Avaliar a sensibilidade de isolados de *Salmonella* spp. a cinco antibióticos utilizados no setor de produção avícola.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Obtenção dos extratos

Os extratos de própolis em sua forma sólida foram extraídos e caracterizados no Centro Universitário SENAI CIMATEC - Bahia. Extratos provenientes da própolis verde (Quadro 2) foram diluídos em etanol para que fosse avaliada sua atividade antimicrobiana sobre diferentes sorotipos de *Salmonella enterica*.

QUADRO 2 - Extrato da própolis verde obtido por extração etanólica e ultrassônica

Tipo de própolis	Tipo de extração	Localidade	Ano
Verde	Etanólica	Queluzito - Minas Gerais	2018
	Ultrassônica	Queluzito - Minas Gerais	2018

#### 4.1.1 Determinação dos compostos fenólicos totais

A determinação de compostos fenólicos totais dos extratos de própolis foi feita de acordo com o método espectrofotométrico de Folin-Ciocalteu descrito por Woisky e Salatino<sup>152</sup>, usando ácido gálico como padrão. O etanol (95%) foi usado para dissolver os extratos, a fim de se obter uma concentração de 0,1 mg/mL. Em seguida, retirou-se 0,5 mL da alíquota do extrato e misturou-se com 2,5 mL de solução aquosa de Folin-Ciocalteu (10%) e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A solução foi colocada em banho maria com regulação térmica a 50° C durante 5 minutos (Marconi, M127, Brasil), e depois a absorbância foi medida num espectrofotômetro (Femto- 700 plus) a 765 nm, utilizando cubeta de quartzo com caminho óptico de 10 mm e volume de 3,5 mL. Os resultados das concentrações de compostos fenólicos totais foram comparados a uma curva padrão de ácido gálico (equivalentes de ácido gálico) (mgGAE.g<sup>-1</sup>) nas mesmas condições. Todas as análises foram executadas em triplicata.

#### 4.1.2 Determinação do teor de flavonoides totais

A determinação de flavonoides dos extratos foi realizada de acordo com o método colorimétrico do cloreto de alumínio<sup>63</sup>. Inicialmente, 2,0 mL de cada extrato (0,3 mg/mL) foram transferidos para o tubo de ensaio e adicionados 2,0 mL de solução metanólica de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) a 2%. As amostras foram homogeneizadas e deixadas sob o abrigo da luz por um período de 30 min. A absorbância das amostras foi medida em um espectrofotômetro

(Femto - 700 plus) a 415 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando soluções conhecidas de padrão de quercetina para elaborar uma curva padrão. Além disso, uma amostra em branco foi preparada nas mesmas condições e a quantidade de teor de flavonoides foi expressa como equivalentes de quercetina (EQ) (mg EQ/g). Todas as análises foram executadas em triplicata.

#### 4.1.3 Determinação da atividade antioxidante total pelo radical livre DPPH

A capacidade antioxidante dos extratos das própolis foi determinada utilizando-se 1,1-difenil-2-picrilidrazil (DPPH), de acordo com a metodologia descrita por Molyneux<sup>153</sup>. Os extratos foram diluídos na concentração de 50 µg.mL<sup>-1</sup> em triplicatas. Em seguida, 1,0 mL de cada diluição foi transferido para um tubo de ensaio contendo 3,0 mL de solução etanólica de DPPH (0,004%). Após 30 minutos de incubação no escuro à temperatura ambiente, mediu-se a redução do radical livre DPPH lendo a absorbância em um espectrofotômetro (Femto -700 plus) a 517 nm. Procedimento similar foi realizado substituindo a amostra de extrato por etanol, obtendo dessa forma o branco. A porcentagem de inibição do radical DPPH foi calculada através da equação abaixo:

% de sequestro =  $100 - [(m\u00e9dia \text{ das absorb\u00e2ncias} \times 100) / \text{absorb\u00e2ncia em branco}]$  (Equa\u00e7\u00e3o 1).

## 4.2 Bact\u00e9rias de cole\u00e7\u00f5es e isolados de *Salmonella* spp.

Duas cepas da cole\u00e7\u00e3o americana *American Type Culture Collection* (ATCC) subsidiaram os ensaios, sendo utilizadas *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028). Al\u00e9m destas cepas refer\u00eancia, 30 isolados de *Salmonella enterica*, isolados de alimento de origem av\u00edcola e *swab* de superf\u00edcie, foram selecionados de acordo com a ocorr\u00eancia em campo, ra\u00e7\u00f5es, carca\u00e7as e pelos surtos registrados no mundo (Quadro 3).

A sorotipifica\u00e7\u00e3o foi realizada por Laborat\u00f3rio Nacional Refer\u00eancia Funda\u00e7\u00e3o do Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), pelo Laborat\u00f3rio de Enterobact\u00e9rias.

QUADRO 3 - Cepas ATCC e estirpes de *Salmonella* utilizadas e suas respectivas fontes

<b>Sorovar</b>	<b>Fonte</b>
<i>Salmonella</i> Enteritidis	ATCC 13076
<i>Salmonella</i> Typhimurium	ATCC 14028
<i>Salmonella</i> Agona	Swab de superfície AM
<i>Salmonella</i> Anatum	Swab de superfície AM
<i>Salmonella</i> Cerro	Swab de superfície AM
<i>Salmonella</i> Infantis	Filé de peito AL
<i>Salmonella</i> Minnesota	Asa AL
<i>Salmonella</i> Saintpaul	Asa AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>1</sup>	Filé de peito AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>2</sup>	Filé de peito AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>3</sup>	Filé de peito AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>4</sup>	Filé de peito AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>5</sup>	Filé de peito AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>6</sup>	Filé de peito AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>7</sup>	Carçaça resfriada de frango AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>8</sup>	Filé de peito AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>9</sup>	Carçaça resfriada de frango AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>10</sup>	Linguiça resfriada de frango AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>11</sup>	Coxa desossada AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>12</sup>	Carçaça de frango resfriada AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>13</sup>	Filé de peito AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>14</sup>	Swab de superfície AM
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>15</sup>	Coxa e sobrecoxa desossadas AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>16</sup>	Carçaça de frango resfriada AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>17</sup>	Carçaça de frango resfriada AL
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>18</sup>	Swab de superfície AM
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>19</sup>	Swab de superfície AM
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>1</sup>	Carçaça de frango resfriada AL
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>2</sup>	Ovo Integral Desidratado AL
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>3</sup>	Carçaça de frango resfriada AL
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>4</sup>	Filé de peito AL
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>5</sup>	Empanado de frango AL

Legenda: Ambiental – AM; Alimentar – AL.

### 4.3 Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) dos extratos de própolis

As culturas bacterianas, previamente armazenada 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 sua ativação, os tubos foram incubados em estufa à 37±1°C por 21±3 horas. Após o crescimento bacteriano, foi realizado estriamento em placas contendo o ágar BHI, incubadas a 37±1°C por 21±3 horas. Após a incubação foram preparadas suspensões em solução aquosa de NaCl a 0,85 % m/v em 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 da CIM foi utilizado o método de microdiluição em placas de 96 poços descrito pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute*<sup>154</sup>. Foram testadas 11 concentrações de cada extrato de própolis, as colunas de 1 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; 0,2 e 0,1 mg/mL<sup>-1</sup>, ou seja, variando de 0,1 a 100 mg/mL<sup>-1</sup> (Figura 1).

Solução de resazurina (0,1% m/v) foi utilizada para determinar a viabilidade dos microrganismos após a exposição à própolis<sup>155</sup>. A CIM 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 determinação da CBM foi feita semeadura em ágar BHI ou ágar *Salmonella* diferencial (Meio RajHans) de uma alíquota de 10 µL, obtida nos poços sem crescimento bacteriano anteriormente para CIM e incubadas a 37±1°C por 21±3 horas. Assim, a CBM foi obtida a partir da menor concentração capaz de provocar eliminação bacteriana. Todos os testes experimentais foram realizados em duplicata.

**PLACA 1 - *Salmonella* Schwarzengrund 1 + *Salmonella* Schwarzengrund 2 - Própolis Verde Etanólico + Própolis Verde Ultrassônico**

	100	50	25	12,5	6,25	3,12	1,56	0,8	0,4	0,2	0,1	diluições em g/mL
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	S.S 1/PVE											m.o. + R
B	S.S 1/PVE											m.o. + R
C	S.S 1/PVU											m.o. + R
D	S.S 1/PVU											m.o. + R
E	S.S 2/PVE											m.o. + R
F	S.S 2/PVE											m.o. + R
G	S.S 2/PVU											m.o. + R
H	S.S 2/PVU											m.o. + R

Legenda: PVE - própolis verde etanólico, PVU – própolis verde ultrassônico, m.o – microrganismo, R – resazurina.

FIGURA 1 – Modelo de microplaca dos isolados *Salmonella* Schwarzengrund 1 e 2. As colunas de 2 a 11 correspondem respectivamente às seguintes diluições de cada extrato: 100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,8; 0,4; 0,2 e 0,1 mg/mL<sup>-1</sup>, respectivamente. A coluna 12 representa o controle da solução de resazurina a 0,01% (presença do microrganismo sem adição do extrato da própolis).

#### 4.4 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>156</sup>. Os isolados criopreservados em freezer -80°C foram plaqueados em ágar BHI, incubados por 24 horas a 37±1°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 x 10<sup>6</sup> 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±1°C de 18 a 24 horas.

O critério de escolha dos antimicrobianos baseou-se na utilização dessas drogas em aviários. Os antimicrobianos e as concentrações em microgramas testadas foram: amicacina (30µg), norfloxacin (10µg), ceftriaxona (30µg), ceftiofur (30µg), e doxiciclina (30µg). As classes de antimicrobianos avaliadas neste estudo são aminoglicosídeo, quinolona,

cefalosporina e tetraciclina. As cepas *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) e *Escherichia coli* (ATCC 25922) foram utilizadas como cepas controle da qualidade dos ensaios.

## 5. RESULTADOS

Na Tabela 1 estão descritos os resultados para o conteúdo de compostos fenólicos totais, flavonoides e atividade antioxidante dos extratos de própolis obtidos por dois métodos de extração (etanólica - EtOH e ultrassônica - US).

TABELA 1 - Determinação do conteúdo de compostos fenólicos totais (mg EAG/g), flavonoides (mg EQ/g) e da atividade antioxidante por DPPH (%) de extratos de amostra obtida por extração etanólica (EtOH) e ultrassônica (US).

Amostras	Compostos Fenólicos	Flavonoides	DPPH (%)
	(mg EAG/g)	(mg EQ/g)	
Verde MG EtOH	208,97±1,44 <sup>a</sup>	54,27±0,12 <sup>a</sup>	62,46±0,46 <sup>a</sup>
Verde MG US	189,26±0,32 <sup>a</sup>	55,00±0,81 <sup>a</sup>	61,27±0,17 <sup>a</sup>

Legenda: EtOH – Extrato obtido por extração etanólica; US – Extrato obtido por extração assistida por ultrassom. Valores com a mesma letra na mesma coluna não apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ) usando o teste Tukey em um nível de confiança de 95%.

Dentre os dois diferentes tipos de extração da própolis verde avaliados, para as cepas de referência *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076) e *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028) todos apresentaram atividade bacteriostática (Tabela 2). A menor CBM foi observada nas duas cepas, em diferentes tipos de extrações. Já a CBM para *Salmonella* Enteritidis na extração US não foi possível ser avaliada, estimando-se então, que para esta cepa a concentração da própolis que promoveria tal efeito é maior que a testada (100 mg/mL).

TABELA 2 - Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato da própolis verde obtido por extração etanólica e ultrassônica em concentrações variando de 0,1 a 100 mg/mL<sup>-1</sup> frente a cepas de referência

Extratos	<i>Salmonella</i> Enteritidis (ATCC 13076)		<i>Salmonella</i> Typhimurium (ATCC 14028)	
	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)	CIM (mg/mL)	CBM (mg/mL)
Verde MG EtOH	6,25	50	25	100
Verde MG US	25	> 100	12,5	50

Legenda: Verde - própolis verde, MG - Minas Gerais, EtOH - extração etanólica e US - extração ultrassônica.

Em relação às estirpes de campo, observou-se ação antimicrobiana dos extratos da própolis verde nos 30 isolados de origem avícola. Para todos foram obtidas CIM e CBM descritas na Tabela 3.

TABELA 3 – Determinação de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do extrato da própolis verde obtido por extração etanólica e ultrassônica em concentrações variando de 0,1 a 100mg/mL<sup>-1</sup> em isolados de origem alimentar e ambiental

Isolados	Verde MG EtOH		Verde MG US	
	CIM	CBM	CIM	CBM
	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)	(mg/mL)
<i>Salmonella</i> Agona	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Anatum	12,5	50	6,25	> 100
<i>Salmonella</i> Cerro	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Infantis	6,25	50	25	50
<i>Salmonella</i> Minnesota	6,25	50	6,25	50
<i>Salmonella</i> Saintpaul	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>1</sup>	12,5	50	6,25	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>2</sup>	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>3</sup>	12,5	50	12,5	100
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>4</sup>	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>5</sup>	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>6</sup>	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>7</sup>	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>8</sup>	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>9</sup>	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>10</sup>	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>11</sup>	6,25	50	12,5	100
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>12</sup>	6,25	50	6,25	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>13</sup>	6,25	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>14</sup>	25	50	25	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>15</sup>	12,5	50	6,25	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>16</sup>	12,5	50	6,25	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>17</sup>	6,25	50	6,25	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>18</sup>	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>19</sup>	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>1</sup>	12,5	50	12,5	50
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>2</sup>	12,5	50	6,25	50
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>4</sup>	12,5	50	6,25	50
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>5</sup>	12,5	50	12,5	100

Legenda: Verde - própolis verde, MG - Minas Gerais, EtOH - extração etanólica e US - extração ultrassônica.

Para o perfil fenotípico relacionado a sensibilidade aos antimicrobianos, observou-se (Tabela 4) que houve variabilidade para os diferentes grupos e mecanismos de ação. As cepas referência foram sensíveis a todos os antibióticos. Foi identificada resistência cruzada para o grupo de cefalosporinas (grupos com mesmo mecanismo de ação) e resistência múltipla (antibióticos com mais de dois mecanismos de ação) (Tabela 5). Isolados de *Salmonella* Heidelberg e *Salmonella* Schwarzengrund demonstraram resistência concomitante a ceftriaxona e ceftiofur, ambos cefalosporinas de terceira geração da classe  $\beta$ -lactâmicos.

TABELA 4 - Perfil de suscetibilidade dos isolados de *Salmonella enterica* aos antimicrobianos

Sorotipo	Tipo de amostra	AMI	NOR	CRO	CTF	DOX
<i>Salmonella</i> Enteritidis	controle	S	S	S	S	S
<i>Salmonella</i> Thyphimurium	controle	S	S	S	S	S
<i>Escherichia coli</i>	controle	S	S	S	S	S
<i>Salmonella</i> Agona	Swab de superfície	S	S	R	I	R
<i>Salmonella</i> Anatum	Swab de superfície	I	S	S	S	S
<i>Salmonella</i> Cerro	Swab de superfície	S	S	R	S	R
<i>Salmonella</i> Infantis	Filé de peito	S	S	R	I	S
<i>Salmonella</i> Minnesota	Asa	S	S	R	S	I
<i>Salmonella</i> Saintpaul	Asa	S	S	S	S	S
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>1</sup>	Filé de peito	S	S	R	I	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>2</sup>	Filé de peito	S	S	I	I	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>3</sup>	Filé de peito	S	S	I	I	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>4</sup>	Filé de peito	S	S	R	I	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>5</sup>	Filé de peito	S	S	R	R	I
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>6</sup>	Filé de peito	S	S	R	R	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>7</sup>	Carcaça resfriada de	S	I	R	S	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>8</sup>	Filé de peito	S	S	I	I	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>9</sup>	Carcaça resfriada de	S	S	R	I	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>10</sup>	Linguiça resfriada	S	S	I	I	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>11</sup>	Coxa desossada	S	S	R	R	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>12</sup>	Carcaça de frango	S	S	R	R	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>13</sup>	Filé de peito	S	S	R	R	I
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>14</sup>	Swab de superfície	S	S	R	R	I
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>15</sup>	Coxa e sobrecoxa	S	S	S	S	S
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>16</sup>	Carcaça de frango	S	S	R	S	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>17</sup>	Carcaça de frango	I	S	S	S	S
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>18</sup>	Swab de superfície	S	S	R	I	R
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>19</sup>	Swab de superfície	S	S	S	S	S
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>1</sup>	Carcaça de frango	S	S	R	R	R
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>2</sup>	Ovo Integral	S	S	S	S	S
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>3</sup>	Carcaça de frango	S	S	R	R	R
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>4</sup>	Filé de peito	S	S	R	I	S
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>5</sup>	Empanado de frango	S	S	S	S	S

Legenda: AMI: amicacina (30 $\mu$ g), NOR: norfloxacin (10 $\mu$ g), CRO: ceftriaxona (30 $\mu$ g), CTF: ceftiofur (30 $\mu$ g) e DOX: doxiciclina (30 $\mu$ g); S: sensível, I: intermediário, R: resistente.

Os percentuais de resistência para os antimicrobianos nos 30 isolados de *Salmonella* spp. (Figura 2) se refere ao somatório dos isolados classificados como resistentes e intermediários. Os isolados classificados como intermediários (Tabela 4) foram considerados organismos resistentes, já que a aquisição e a transição de suscetível para resistente deve ser considerada. 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>157</sup>). Foram caracterizados como isolados multirresistentes aqueles que apresentaram resistência a duas ou mais classes de antimicrobianos.

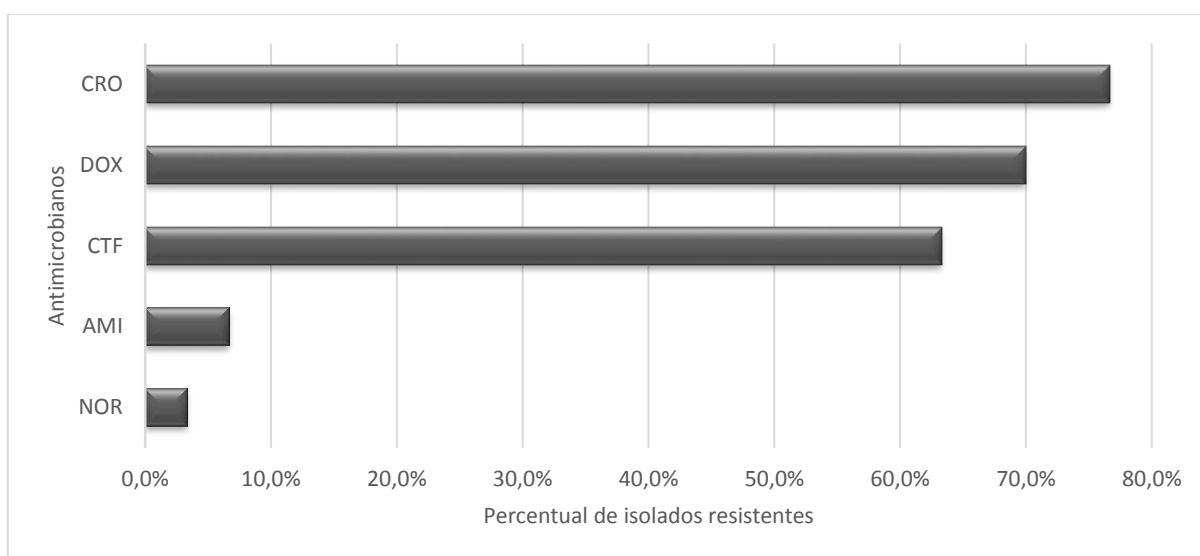


FIGURA 2 - Frequência (%) de resistência antimicrobiana dos 30 isolados de origem avícola e ambiental. AMI: amicacina (30 $\mu$ g), CTF: ceftiofur (30 $\mu$ g), CRO: ceftriaxona (30 $\mu$ g), DOX: doxiciclina (30 $\mu$ g) e NOR: norfloxacina (10 $\mu$ g).

Os isolados de campo apresentaram resistência cruzada e múltipla. Em 83,3% (25/30) das amostras foram resistentes a um ou mais agentes antimicrobianos utilizados. Cinco isolados (16,66%) foram sensíveis a todos os antimicrobianos. Foi identificado 21 isolados multirresistentes, os quais apresentaram resistência para duas ou mais classes de antimicrobianos. A resistência cruzada ocorreu em 63,3% (19/30) dos isolados frente as cefalosporinas (Tabela 5).

TABELA 5 - Perfis de resistência para os isolados de *Salmonella enterica* avaliados

<b>Sorotipo</b>	<b>Perfis de resistência</b>
<i>Salmonella</i> Agona	CRO CTF
<i>Salmonella</i> Anatum	AMI
<i>Salmonella</i> Cerro	CRO DOX
<i>Salmonella</i> Infantis	CRO CTF
<i>Salmonella</i> Minnesota	CRO DOX
<i>Salmonella</i> Saintpaul	-
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>1</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>2</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>3</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>4</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>5</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>6</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>7</sup>	NOR CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>8</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>9</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>10</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>11</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>12</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>13</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>14</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>15</sup>	-
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>16</sup>	CRO DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>17</sup>	AMI
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>18</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Heidelberg <sup>19</sup>	-
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>1</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>2</sup>	-
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>3</sup>	CRO CTF DOX
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>4</sup>	CRO CTF
<i>Salmonella</i> Schwarzengrund <sup>5</sup>	-

Legenda: AMI: amicacina (30µg), NOR: norfloxacina (10µg), CRO: ceftriaxona (30µg), CTF: ceftiofur (30µg) e DOX: doxiciclina (30µg).

## 6. DISCUSSÃO

Neste estudo, não houve diferença significativa dos compostos de cada amostra em relação ao tipo de extração, pois, apresentaram valores muito próximos de CIM, CBM, compostos fenólicos totais (mg EAG/g), flavonóides (mg EQ/g) e atividade antioxidante por DPPH (%). Sendo assim, a extração ultrassônica apresenta vantagens sobre a extração etanólica, por ser mais rápida, menor custo, redução no uso de solventes orgânicos, obtenção de extratos com alto valor biológico e uso de dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) como solvente extrator<sup>158</sup>.

Atentando para a composição, pode-se afirmar que os biocompostos identificados e suas respectivas concentrações permitem atestar capacidade antimicrobiana dos extratos, pelo quantitativo de compostos fenólicos totais, bem como flavonoides e radical DPPH. No entanto, supõe-se que melhor capacidade de ação sobre microrganismos Gram-positivos e pior em microrganismos Gram-negativos decorre da conformação da parede celular. Outro elemento importante refere-se ao fato da sazonalidade para maior ou menor concentração dos biocompostos<sup>159</sup>, apesar de não ser um item avaliado neste estudo.

A quantidade total de compostos fenólicos, flavonóides e atividade antioxidante são parâmetros importantes para avaliar a qualidade e o potencial biológico de extratos da própolis, principalmente considerando a grande biodiversidade brasileira. De acordo com Machado et al.<sup>23</sup>, quando comparado ao método de extração, os extratos obtidos por extração etanólica apresentaram os melhores resultados de atividades antimicrobianas, antioxidantes e o maior teor de ácidos fenólicos totais e flavonoides em relação ao extrato ultrassônico, diferente dos resultados obtidos neste estudo.

Há grande controvérsia em relação ao conteúdo de flavonoides presentes em amostras de própolis brasileira, nas quais os ácidos fenólicos são geralmente muito mais abundantes<sup>23</sup>, estando de acordo com os teores obtidos. De acordo com Salgueiro<sup>160</sup> à medida os teores de compostos fenólicos e flavonoides aumentam nas amostras, a atividade antioxidante aumenta o seu percentual. Esta informação pode ser confirmada com dados da literatura que afirmam que a atividade antioxidante está diretamente correlacionada aos compostos fenólicos e flavonoides totais<sup>161,162,163</sup>. A constatação da atividade antimicrobiana e antioxidante nos extratos da própolis verde poderá contribuir para validar seu uso como alternativa aos antimicrobianos.

O potencial antimicrobiano de diferentes extratos de própolis utilizando os mesmos princípios deste estudo foi avaliado por outros pesquisadores. Silva et al.<sup>164</sup>, ao avaliarem a

atividade antimicrobiana de vários extratos de própolis de diferentes regiões do Brasil frente a bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Enterococcus* sp.), Gram-negativas (*Klebsiella* sp. e *Escherichia coli*) e um fungo (*Candida albicans*), encontraram resultados de CIM significativos para um tipo de própolis verde proveniente do Estado de Minas Gerais obtida por extração ultrassônica e etanólica. Pinheiro et al.<sup>165</sup> ao avaliarem as propriedades de inibição antibacteriana dos diferentes tipos de própolis frente à sete bactérias Gram-positivas e oito Gram-negativas, por meio de uma revisão da literatura, observaram que dentre os estudos avaliados, a própolis verde não foi efetiva, o que representa contradição em relação aos dados deste estudo, já que a própolis verde apresentou efeito bacteriostático para todos os isolados testados e efeito bactericida para a maioria deles.

Machado et al.<sup>23</sup> anteriormente mencionado, identificaram que todos os extratos testados apresentaram atividade antimicrobiana tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* respectivamente, corroborando com o presente estudo. Pode-se observar neste estudo, que os mesmos sorotipos tiveram comportamentos diferentes em relação à tolerância e sobrevivência mediante os extratos de própolis avaliados, mesmo aqueles provenientes de um mesmo tipo de fonte de isolamento (Tabela 4). Os isolados se comportaram de forma semelhante à cepa referência *Salmonella* Enteritidis frente ao extrato etanólico, apresentando os mesmos valores de CIM e CBM para *Salmonella* Infantis, *Salmonella* Minnesota e em quatro de *Salmonella* Heidelberg (11-13 e 17). Em relação ao extrato ultrassônico, não houve comportamento semelhante. O comportamento identificado em sorovares e na maioria dos isolados de *Salmonella* Heidelberg e em dois de *Salmonella* Schwarzengrund reforçou o padrão de resposta para CIM e CBM da cepa referência *Salmonella* Typhimurium, discordando dos achados de Fujimoto<sup>166</sup>, quando avaliou a própolis verde por disco difusão para *Salmonella*. Desta forma, resultados discordantes nem sempre podem circunscrever ao princípio e ao microrganismo, mas também ao método que determina influência de resposta.

A CIM observada neste estudo (6,25 a 25 mg/mL) é semelhante as descritas por Przybyłek & Karpinski<sup>167</sup>, onde observaram que estudos envolvendo a própolis e *Salmonella* spp., os resultados para CIM variaram de 0,032 a 14,7 mg/mL. As concentrações dos extratos utilizadas neste estudo foram definidas de acordo com resultados obtidos por estudos realizados anteriormente, que demonstraram que a própolis possui menor atividade frente a microrganismos Gram-negativos. Diversos estudos estão sendo realizados para determinar a atividade antimicrobiana da própolis de diversas regiões contra vários tipos de bactérias, sendo mais eficiente nas espécies Gram-positivas<sup>23,167,168,169</sup>. Entretanto, outros estudos confirmaram

a atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, mesmo sendo baixo o efeito dos extratos testados<sup>122,170</sup>.

A própolis atua diretamente na parede celular das bactérias, alterando a permeabilidade da membrana citoplasmática aos íons, causando a dissipação do potencial de membrana. Sendo essencial o gradiente eletroquímico de prótons através da membrana para a bactéria manter a síntese de ATP, o transporte pela membrana plasmática e a motilidade, o que contribui para a ação citotóxica da própolis, podendo ainda diminuir a resistência das células a outros compostos antibacterianos, explicando a maior sensibilidade frente aos microrganismos Gram-positivos do que Gram-negativos<sup>116</sup>. Isso ocorre porque a parede celular dos microrganismos Gram-positivos é mais permeável, possibilitando que agentes externos alterem mais facilmente a membrana plasmática<sup>117</sup>. Em relação as 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>63,122</sup>.

Entretanto, essas particularidades não inviabilizam este estudo, pois, além da atuação da própolis frente a microrganismos Gram-negativos ser descrita na literatura, os resultados observados neste estudo mostraram que os dois extratos de própolis testados inibiram todos os isolados avaliados, de forma que não foi apresentada resistência a nenhuma concentração da própolis testada. Porém, em relação a ação bactericida, houve apenas um isolado que, apesar de inibido, não foi inativado, sugerindo que este isolado seja o mais resistente de todos avaliados.

Diversas pesquisas que analisaram o efeito antimicrobiano da própolis, possuem resultados semelhantes, como o estudo de AL-Ani et al.<sup>171</sup> avaliando a atividade antimicrobiana da própolis europeia coletada de várias regiões geográficas frente *Salmonella choleraesuis*, que observaram um CIM de 2,5 mg/mL e CBM de 5 mg/mL. De acordo com Orsi et al.<sup>172</sup> os valores de CIM encontrados para a própolis búlgara sobre *Salmonella Enteritidis* isolada de alimentos e para *Salmonella Typhimurium*, isolada de infecção humana foi de 260 mg/mL para ambos isolados. Kalia et al.<sup>173</sup> ao avaliarem o efeito antimicrobiano de três extratos de própolis indiana em *Salmonella enterica* sorotipo Typhimurium, encontraram CIM de 160 mg/mL e CBM de 250 mg/mL. Nina et al.<sup>174</sup> ao avaliarem o efeito antibacteriano do extrato metanólico de própolis do Chile coletadas em diferentes regiões geográficas contra *Salmonella* spp. observaram concentrações do extrato variando de 0,625 mg/mL a 0,25 mg/mL. As diferenças encontradas nos valores de CIM e CBM em diversos estudos, ocorrem devido a variação na composição dos

extratos das própolis produzidas a partir de certas espécies de plantas e do período do ano, pelas diferentes extrações e concentrações de extrato utilizadas<sup>175</sup>.

Em relação ao perfil de suscetibilidade a antimicrobianos, os altos percentuais de resistência identificados no presente estudo (83,33%) mostram a importância da união entre os setores veterinário e de saúde pública na detecção e notificação adequadas de patógenos zoonóticos veiculados por alimentos. De acordo com dados da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) os maiores percentuais de resistência para cepas de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango no Brasil foram obtidos para estreptomicina (89,3%), sulfonamidas (72,4%), florfenicol (59,2%), ampicilina (44,8%), ácido nalidixico (44,0%), ceftiofur (22,8%), aztreonam (20,4%), enrofloxacina (18,4%), ceftriaxona (17,3%) e cefalotina (12,4%) e tetraciclina (11,2%)<sup>176</sup>. Tais valores são inferiores aos encontrados neste estudo para ceftiofur (63,3%), ceftriaxona (76,7,2%) e tetraciclina (70%). Os níveis de resistência indicam que os antimicrobianos devem ser utilizados nos aviários de forma mais prudente, buscando, assim, minimizar a disseminação de cepas resistentes.

Baixos índices de resistência a amicacina (1/48, 2,1%) e à tetraciclina (3/48, 6,2%) foram descritos por Santos et al.<sup>177</sup> ao analisarem isolados de *Salmonella* spp. de amostras de carcaças congeladas de frango. O resultado foi semelhante a este estudo em relação à amicacina, que representou 6,7% (2/30) de resistência aos isolados testados. Essa baixa resistência pode demonstrar que o uso deste agente antimicrobiano está sendo melhor administrado no setor em questão nos últimos anos.

Neste estudo foi observada resistência de 3,3% (1/30) dos isolados a quinolona testada (norfloxacina), representando 12,5% (1/8) dos sorotipos avaliados (Tabela 6). Dados semelhantes foram observados por Souza et al.<sup>178</sup>, sendo que todos os sorotipos de *Salmonella* spp. testados foram sensíveis à norfloxacina. Também foram semelhantes aos resultados de Ribeiro et al.<sup>179</sup>, com 8,8% de amostras resistentes de *Salmonella* Hadar à enrofloxacina, 3,8% à ciprofloxacina e 100% de suscetibilidade à norfloxacina. Cardoso et al.<sup>180</sup> encontraram resultados de 100% de suscetibilidade de *Salmonella* Enteritidis à norfloxacina. O resultado deste estudo, demonstrou que a maioria dos isolados foram suscetíveis a este agente antimicrobiano, representando um dado importante, para resguardar a sua eficiência.

O ceftiofur é um agente antimicrobiano pertencente ao grupo das cefalosporinas de terceira geração ( $\beta$ -lactâmico) intimamente relacionado a ceftriaxona. Considerando que os microrganismos resistentes ao ceftiofur podem ser resistentes à ceftriaxona, o uso desse agente antimicrobiano na alimentação animal está sob crescente discussão por ser um potencial agente responsável pelo surgimento e disseminação da resistência à ceftriaxona em *Salmonella* spp. e

outros patógenos entéricos em humanos<sup>181</sup>. Neste estudo 63,3% (19/30) dos isolados foram resistentes ao ceftiofur e 76,7% (23/30) dos isolados foram resistentes a ceftriaxona, representando o maior percentual de resistência.

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<sup>182</sup>. Neste estudo, a doxiciclina apresentou segundo maior percentual de resistência (70%). Esse dado corrobora a pesquisa realizada por Duarte et al.<sup>183</sup>, que avaliaram a suscetibilidade de *Salmonella* spp. isoladas de carcaças de frango de corte e verificaram que 31,6% das amostras foram resistentes à tetraciclina.

Por tais achados, pode-se apontar que a resistência às bases antimicrobianas de maior eleição é real e alta, o que corrobora com a necessidade de identificar alternativas que possam ser investigadas, processadas e aplicadas em diferentes segmentos da produção animal. A própolis pode ser uma alternativa viável aos antimicrobianos, por possuir potencial de ação expressivo para *Salmonella* spp., que poderia ser aplicada na indústria de alimentos como suplemento alimentar na dieta de animais de produção<sup>184</sup>, diminuindo assim os efeitos do estresse térmico e melhorando a conversão alimentar<sup>185</sup> e detergentes com a finalidade de combater a formação de biofilmes a ser utilizado na higienização das indústrias como ferramenta de controle<sup>186</sup>. Cada vez mais pesquisas sobre a aplicação de própolis na indústria de alimentos se destacam e tendem a se tornarem frequentes, devido as suas propriedades biológicas e a demanda do mercado por produtos naturais.

## 7. CONCLUSÃO

Pode-se concluir que os compostos identificados nos extratos de própolis verde conferem ação antimicrobiana e antioxidante. Tanto o extrato etanólico quanto o ultrassônico da própolis verde apresentaram efeito inibitório e bactericida para *Salmonella enterica*, com ação diferenciada conforme o sorotipo avaliado. As ações de inibição e eliminação foram identificadas em sorovares provenientes de matrizes alimentares e de ambiente. Identificou-se resistência cruzada e múltipla para bases antimicrobianas convencionais e sensibilidade concomitante aos extratos de própolis em concentrações variadas.

## REFERÊNCIAS

1. Cardoso M. Uso racional de antimicrobianos e novas alternativas. Departamento de Medicina Veterinária Preventiva, FAVET – UFRGS. 2017.
2. Gumbo T. Princípios gerais do tratamento antimicrobiano. *in*: Brunton LL, Chabner BA, Knollmann BC. As bases farmacológicas da terapêutica de Goodman & Gilman. Porto Alegre: AMGH. 2012;12:1365-1381.
3. Hur J, Jawale C, Lee JH. Antimicrobial resistance of *Salmonella* isolated from food animals: A review. *Food Res Inter*. 2012;45(2):819-30.
4. World Organisation for Animal Health. Fact sheets antimicrobial resistance. 2018. [acesso 08 ago 2019] Disponível em: [www.oie.org](http://www.oie.org).
5. World Health Organization. Who critically important antimicrobials for human medicine. 2017. [acesso 8 ago 2019] disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/cia2017.pdf?ua=1>
6. Barros R, Vieira SL, Favero A, Taschetto D, Mascarello NC, Cemin HS. Reassessing flavophospholipol effects on broiler performance. *Rev Bras Zootec*. 2012;41: 2458-2462.
7. Garcia-Migura L, Hendriksen RS, Fraile L, Aarestrup FM. Antimicrobial resistance of zoonotic and commensal bacteria in europe: the missing link between consumption and resistance in veterinary medicine. *Vet Microbiol*. 2014;170:1-9.
8. Stanton TB. A call for antibiotic alternatives research. *Trends Microbiol*. 2013;21: 111-113.
9. Chantziaras I, Boyen F, Callens B, Dewulf J. Correlation between veterinary antimicrobial use and antimicrobial resistance in food-producing animals: a report on seven countries. *J Antimicrob Chemother*. 2014;69: 827-834.
10. World Organisation for Animal Health. *Salmonella* (non-typhoidal). 2018. [acesso 08 ago 2019] disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>.
11. Brasil. Ministério da Saúde. Surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil. 2018. [acesso 18 ago 2019] disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/julho/02/apresentacao-surtos-dta-junho-2018.pdf>.
12. EFSA and ECDC (European Food Safety Authority and European Centre for Disease Prevention and Control), 2015. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonoses, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2013. *EFSA Journal* 2015;13(1):3991, 165 pp. doi:10.2903/j.efsa.2015.3991
13. Cosby DE, Cox NA, Harrison MA, Wilson JL, Buhr RJ, Fedorka-Cray PJ. *Salmonella* and antimicrobial resistance in broilers: a review. *The Journal of Applied Poultry Research*. 2015;24(3):408-26.
14. Muniz, EC. Atualidades no estudo das salmoneloses aviárias. XIII Simpósio Brasil Sul de avicultura e IV Brasil Sul poultry fair, Chapecó. Núcleo Oeste de Médicos Veterinários e Zootecnistas. Concórdia: Embrapa suínos e aves. 2012;p.13-26.
15. Lima ET, Andreatti-Filho RL, Pinto JPAN. Perfil de susceptibilidade antimicrobiana de sorotipos de salmonella isolados de produtos avícolas. *Veterinária e Zootecnia, Botucatu*. 2009;162(2):394-400.
16. Organização Mundial da Saúde. OMS recomenda que agricultores e indústria alimentar parem de usar antibióticos em animais saudáveis para preservar sua eficácia. 2017. Disponível em: [https://www.paho.org/bra/index.php?option=com\\_content&view=article&id=5540:oms-recomenda-que-agricultores-e-industria-alimentar-parem-de-usar-antibioticos-em-animais-saudaveis-para-preservar-sua-eficacia&itemid=812](https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5540:oms-recomenda-que-agricultores-e-industria-alimentar-parem-de-usar-antibioticos-em-animais-saudaveis-para-preservar-sua-eficacia&itemid=812).
17. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *apidologie*. 1995;26(2):83-99.

18. Falcao SI, Vale N, Gomes P, Domingues MR, Freire C, Cardoso SM. Phenolic profiling of portuguese propolis by lc-ms spectrometry: uncommon propolis rich in flavonoid glycosides. *Phytochem Anal.* 2013;24(4):309-18.
19. Alencar SM, Oldoni TL, Castro ML, Cabral IS, Costa-Neto CM, Cury JA. Chemical composition and biological activity of a new type of brazilian propolis: red propolis. *J Ethnopharmacol.* 2007;113(2):278-83.
20. Barros MP, Sousa JP, Bastos JK, Andrade SF. Effect of brazilian green propolis on experimental gastric ulcers in rats. *J Ethnopharmacol.* 2007;110(3):567-71.
21. Garmus TT, Paviani LC, Queiroga CL, Cabral FA. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*lippia sidoides cham.*) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical co<sub>2</sub>, ethanol and water as solvents. *The Journal of Supercritical Fluids.* 2015;99:68-75.
22. Reis JHO, Barreto GA, Cerqueira JC, et al. Evaluation of the antioxidant profile and cytotoxic activity of red propolis extracts from different regions of northeastern Brazil obtained by conventional and ultrasound-assisted extraction. *PLoS One.* 2019;14(7):e0219063. Published 2019 Jul 5. doi:10.1371/journal.pone.0219063
23. Machado BA, Silva RP, Barreto Gde A, Costa SS, Silva DF, Brandao HN. Chemical composition and biological activity of extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and red propolis derived from different geographic regions in brazil. *Plos One.* 2016;11(1):e0145954.
24. Kujumgiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol.* 1999;64(3):235-40.
25. 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.
26. 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.
27. Taylor PW, Stapleton PD, Paul LJ. New ways to treat bacterial infections. *Drug Discov Today.* 2002;7(21):1086-91.
28. Newman DJ, Cragg GM, Snader KM. The influence of natural products upon drug discovery. *Nat Prod Rep.* 2000;17(3):215-34.
29. Santos MS, Estevinho LM, Carvalho CAL, Morais JS, Conceição ALS, Paula VB, Magalhães-Guedes K and Almeida RCC. Probiotic Yogurt with Brazilian Red Propolis: Physicochemical and Bioactive Properties, Stability, and Shelf Life. *Jour of Food Sci.* 2019;(84):3429-3436. doi:10.1111/1750-3841.14943
30. Costa AS, Machado BAS, Umsza-Guez MA, Cirqueira MG, Nunes SB, Padilha FF. Levantamento dos estudos realizados com a própolis produzida no estado da Bahia. *Sitentibus Série Ciências Biológicas.* 2013;13.
31. Da Costa A, Silva Junior A. Resistência bacteriana aos antibióticos e saúde pública: uma breve revisão de literatura. *Estação Científica (Unifap).* 2017;7(2):45-57. doi:http://dx.doi.org/10.18468/estcien.2017v7n2.p45-57
32. Brasil. Ministério da Saúde. Agência de Vigilância Sanitária. Plano de ação da ANVISA em resistência aos antimicrobianos. 2018.
33. World Organisation for Animal Health. Global plan on antimicrobial resistance. 2015. [acesso 08 ago 2019] Disponível em: <http://www.who.int/antimicrobial-resistance/global-action-plan/en>.

34. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resistência aos antimicrobianos. 2019.
35. Brasil. Ministério da Saúde. Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde. Resistência antimicrobiana: enfoque multilateral e resposta brasileira. 2018. [acesso 15 ago 2019] disponível em: [https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/22/18\\_Tatiana\\_Estrela.pdf](https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/outubro/22/18_Tatiana_Estrela.pdf)
36. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Dispõe sobre a fiscalização de produtos de uso veterinário, dos estabelecimentos que os fabriquem e dá outras providências. Decreto-Lei Nº 467, de 13 de Fevereiro de 1969.
37. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento técnico sobre os procedimentos para a fabricação e o emprego de produtos destinados à alimentação animal com medicamento de uso veterinário. Instrução Normativa nº 65 de 24 de nov 2006.
38. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Plano de Ação Nacional de Prevenção e Controle da Resistência aos Antimicrobianos no Âmbito da Saúde Única – PAN-BR. 2018. [acesso 15 set 2019] disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/dezembro/20/af-pan-br-17dez18-20x28-csa.pdf>
39. Woolhouse, MEJ, Ward M.J. Sources of antimicrobial resistance. *Science*, New York. 2013;341(6153):1460-1461.
40. O'Neill J. Antimicrobial resistance: tackling a crisis for the health and wealth of nations. *Rev Antimicrob Resist*. 2014. [acesso 16 set] disponível em: <http://amr-review.org/Publications>.
41. Ferracini FT, Filho WMB, Almeida SM. Atenção à prescrição médica, 1.ed. São Paulo, Atheneu, 2014.
42. Meireles MAOM. Uso de antimicrobianos e resistência bacteriana: aspectos socioeconômicos e comportamentais e seu impacto clínico e ecológico. [Monografia] (Especialização Em Microbiologia) - Universidade Federal De Minas Gerais, Belo Horizonte. 2008.
43. Costa ALP. Resistência bacteriana aos antibióticos: uma perspectiva do fenômeno biológico, suas consequências e estratégias de contenção. Trabalho de conclusão de curso (Graduação em biologia) – Curso de Ciências Biológicas, Departamento de Ciências Biológicas e da Saúde, UNIFAP, Macapá, 2016.
44. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Resistência aos Antimicrobianos. 2018. [acesso 19 out 2019] disponível em: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumospecuarios/programas-especiais/resistencia-antimicrobianos/ResistnciaaosAntimicrobianos.pdf>
45. Conselho Federal de Medicina Veterinária. Plano nacional de prevenção e controle da resistência aos antimicrobianos é debatido na 316ª plenária do CFMV. 2018. [acesso 20 out 2019] Disponível em: <http://portal.cfmv.gov.br/noticia/index/id/5840/secao/6>.
46. Landers TF. A review of antibiotic use in food animals: perspective, policy, and potential. *Public Health Reports*, Washington, Dc. 2012;127(1):4-22.
47. Van Boeckel TP. Global trends in antimicrobial use in food animals. *Pnas*, Washington, Dc. 2015;112(18):5649-5654.
48. Banskota AH, Tezuka Y, Kadota S. Recent progress in pharmacological research of propolis. *Phytother Res*. 2001;15(7):561-71.
49. Gregory SR, Piccolo N, Piccolo MT, Piccolo MS, Hegggers JP. Comparison of propolis skin cream to silver sulfadiazine: a naturopathic alternative to antibiotics in treatment of minor burns. *J Altern Complement Med*. 2002;8(1):77-83.

50. Pereira ADS, Seixas FRMS, Aquino Neto FRD. Propolis: 100 years of research and future perspectives. *Quím Nova*. 2002;25(2):321-6.
51. Ghisalberti EL. Propolis: A review. <http://dxdoiorg/101080/0005772x197911097738>. 1979;60(2):59-84.
52. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol*. 1998;36(4):347-63.
53. Helfenberg KD. The analysis of beeswax and propolis. *Chemiker Zeitungm*. 1908;31:987-98.
54. Jaubert GF. Origin of the color of beeswax and the composition of propolis. *C R Hebd Seances Acad Sci*. 1927;184:1134-6.
55. Farnesi AP. Efeitos da própolis de abelhas africanizadas e meliponíneos em microorganismos: Universidade de São Paulo; 2007.
56. Marcucci Mc. Propriedades biológicas e terapêuticas dos constituintes químicos da própolis. *Quím Nova*. 1996;19(5):529-36.
57. Park YK, Koo MH, Abreu JA, Ikegaki M, Cury JA, Rosalen PL. Antimicrobial activity of propolis on oral microorganisms. *Curr Microbiol*. 1998;36(1):24-8.
58. Pepeljnjak S, Jalsenjak I, Maysinger D. Flavonoid content in propolis extracts and growth inhibition of bacillus subtilis. *Pharmazie*. 1985;40(2):122-3.
59. Negri G, Marcucci MC, Salatino A, Salatino MLF. Hydrocarbons and monoesters of propolis waxes from Brazil. *Apidologie*. 1998;29(4):305-14.
60. Martinez OA, Soares AEE. Genetic improvement in the commercial Bbeekeeping in production of propolis. *Rev Bras Saúde Prod Anim*. 2012;13(4):982-90.
61. SEBRAE. O aquecido mercado da própolis. 2014 [acesso 05 out 2019] Disponível em: <http://www.sebraemercados.com.br/o-aquecido-mercado-da-propolis/>.
62. Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Apresentação Própolis. In: MAPA, editor. 2017.
63. 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.
64. Park YK, Alencar SM, Aguiar CL. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. *J Agric Food Chem*. 2002;50(9):2502-6.
65. Silva BB, Rosalen PL, Cury JA, Ikegaki M, Souza VC, Esteves A, et al. Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008;5(3):313-6.
66. Dausch A. A propolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas [TESE]: Unicamp; 2007.
67. Bastos EM, Simone M, Jorge DM, Soares AE, Spivak M. In vitro study of the antimicrobial activity of Brazilian propolis against Paenibacillus larvae. *J Invertebr Pathol*. 2008; 97 (3): 273-81.
68. Evans L. Crise econômica faz crescer o uso da própolis verde 2016 [updated 2016-03-14 10:01:00]. Available from: [https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuario/2016/03/14/interna\\_agropecuario,743149/crise-economica-faz-crescer-o-uso-da-propolisverde.shtml](https://www.em.com.br/app/noticia/agropecuario/2016/03/14/interna_agropecuario,743149/crise-economica-faz-crescer-o-uso-da-propolisverde.shtml).
69. Matsuda AH, Almeida-Muradian L. Validated method for the quantification of artepillin-C in brazilian propolis. *Phytochemical Analysis*. 2008;19:179-183.
70. Soares ALF, Bilezikdjian PJ, Elias PG, Medeiros PCM, Souza LAd. Identidade e qualidade de diferentes extratos de própolis: *Gestão em Foco*; 2017. 9:[Available from: [http://unifia.edu.br/revista\\_eletronica/revistas/gestao\\_foco/artigos/ano2017/034\\_identidade\\_qualidade.pdf](http://unifia.edu.br/revista_eletronica/revistas/gestao_foco/artigos/ano2017/034_identidade_qualidade.pdf)].
71. Brasil. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o regulamento técnico sobre

- padrões microbiológicos para alimentos. Diário oficial da república federativa do Brasil, Brasília, DF, 10 jan. 2001. seção 1, 67 p.
72. APACAME. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de própolis. Mensagem Doce. 1999(52):13-4.
  73. Pobiega K, Kraśniewska K, Derewiaka D. *et al.* Comparison of the antimicrobial activity of propolis extracts obtained by means of various extraction methods. *J Food Sci Technol.* 2019;(56):5386–5395. doi:10.1007/s13197-019-04009-9
  74. Marcucci MC, Woisky RG, Salatino A. Uso de cloreto de alumínio na quantificação de flavonóides em amostras de própolis. 1998;46.
  75. Menezes H. Própolis: Uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. 2005;723:405-11.
  76. Funari CS, Ferro VO. Propolis analysis. *Food Sci Technol.* 2006;26(1):171-8.
  77. Mello J, Simões C, Schenkel E, Gosmann G, Mentz LA, Petrovick P. Farmacognosia da planta ao medicamento. 6, editor. Florianópolis: Editora da UFSC; 1999.
  78. Soares SE. Ácidos fenólicos como antioxidantes. *Rev Nutr.* 2002;15(1):71-81.
  79. Serkedjieva J, Manolova N, Bankova V. Anti-influenza virus effect of some propolis constituents and their analogues (esters of substituted cinnamic acids). *J Nat Prod.* 1992;55(3):294-302.
  80. Kujumgiev A, Bankova V, Ignatova A, Popov S. Antibacterial activity of propolis, some of its components and their analogs. *Pharmazie.* 1993;48(10):785-6.
  81. Su ZZ, Lin J, Grunberger D, Fisher PB. Growth suppression and toxicity induced by caffeic acid phenethyl ester (CAPE) in type 5 adenovirus-transformed rat embryo cells correlate directly with transformation progression. *Cancer Res.* 1994;54(7):1865-70.
  82. Borrelli F, Maffia P, Pinto L, Ianaro A, Russo A, Capasso F, et al. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. *Fitoterapia.* 2002;73 Suppl 1:S53-63.
  83. Cicala C, Morello S, Iorio C, Capasso R, Borrelli F, Mascolo N. Vascular effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on isolated rat thoracic aorta. *Life Sci.* 2003;73(1):73-80.
  84. 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.
  85. 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.
  86. 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.
  87. 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.
  88. Conti BJ, Santiago KB, Búfalo MC, Herrera YF, Alday E, Velazquez C, Hernandez J, Sforcin JM. Modulatory effects of propolis samples from Latin America (Brazil, Cuba and Mexico) on cytokine production by human monocytes. *J Pharm Pharmacol.* 2015;67(10):1431-8.
  89. Barros Mp, Lemos M, Maistro El, Leite Mf, Sousa Jp, Bastos Jk, Et Al. Evaluation of antiulcer activity of the main phenolic acids found in brazilian green propolis. *J Ethnopharmacol.* 2008;120(3):372-7.
  90. 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.
91. 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.
  92. Chan GC, Cheung K, Sze DM. The immunomodulatory and anticancer properties of propolis. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2013;44(3):262-73.
  93. Pontin K, Da Silva Filho Aa, Santos Ff, Silva MI, Cunha Wr, Nanayakkara Np, Et Al. In vitro and in vivo antileishmanial activities of a brazilian green propolis extract. *Parasitol Res.* 2008;103(3):487-92.
  94. 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.
  95. Oldoni Tlc, Cabral Isr, D'arce Mabr, Rosalen Pl, Ikegaki M, Nascimento Am, Et Al. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of brazilian propolis. *Separation And Purification Technology.* 2011;77(2):208-13.
  96. Lopes MA. Qualidade dos Produtos Apícolas da Guiné Bissau: Mel e Própolis. [Dissertação] Bragança: Universidade de Salamanca, Instituto Politécnico de Bragança, 2014. 91p.
  97. Lustosa SR, Galindo AB, Nunes LCC, Randau KP, Rolim Neto PJ. Propolis: updates on chemistry and pharmacology. *Rev bras farmacogn.* 2008;18(3):447-54.
  98. Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. *Ev Bas Complement Altern Med.* 2005;2(1):29-32.
  99. Búfalo MC, Figueiredo AS, De Sousa JPB, Candeias JM, Bastos JK, Sforcin JM. Antipoliiovirus activity of *Baccharis dracunculifolia* and propolis by cell viability determination and real-time PCR. *J Appl Microbiol.* 2009;10(7):1669-80.
  100. Ramos AFN, Miranda JL. Propolis: A review of its anti-inflammatory and healing actions. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.* 2007;13(4):697-710.
  101. 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. *Ciên Rur.* 2011;41(10):1800-6.
  102. Bankova V, Galabov AS, Antonova D, Vilhelmovan N, Di Perric B. Chemical composition of Propolis Extract ACF® and activity against herpes simplex virus. *Phytomedicine.* 2014;21(6):1432-8.
  103. Fischer G, Hübner SO, Vargas GD, Vidor T. Imunomodulação pela própolis. *Arq Inst Bio.* 2008;75(2):247-53.
  104. 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.
  105. 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.
  106. 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.
  107. 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.

108. 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.
109. Menezes H, Bacci Jr M, Oliveira SD, Pagnocca FC. Antibacterial properties of propolis and products containing propolis from Brazil. *Apidologie*. 1997;28(2):71-6.
110. Crisan I, Zaharia CN, Popovici F, Jucu V, Belu O, Dascalu C, et al. Natural propolis extract NIVCRISOL in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. *Rom J Virol*. 1995;46(3-4):115-33.
111. Pereira DS, Abrantes MR, Coelho WAC, Freitas MO, Freitas CIA, Silva JBAd. Potencial antibiótico da própolis apícola Potiguar em bactérias de importância veterinária. *Rev Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável*. 2016;11(3).
112. Shub TA, Kagramonova KA, Kivman GY, Tikhonov AI, Gritsenko VI. Antimicrobial activity of propolis extracts. *Pharm Chemic Journal*. 1978;11(9):1242-4.
113. Daferera DJ, Ziogas BN, Polissiou MG. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop Protection*. 2003;22(1):39-44.
114. Figueiredo SM, Nogueira-Machado JA, Almeida Bde M, Abreu SR, de Abreu JA, Filho SA, et al. Immunomodulatory properties of green propolis. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*. 2014;8(2):85-94.
115. Szliszka E, Kucharska AZ, Sokol-Letowska A, Mertas A, Czuba ZP, Krol W. Chemical Composition and Anti-Inflammatory Effect of Ethanolic Extract of Brazilian Green Propolis on Activated J774A.1 Macrophages. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2013;2013:976415.
116. Abubakar MB, Abdullah WZ, Sulaiman SA, Ang BS. Polyphenols as Key Players for the Antileukaemic Effects of Propolis. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 2014:11.
117. Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schereckenberger PC, Winn WC. *Diagnóstico microbiológico*. 5, editor. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. 1465 p.
118. Suzuki I. A própolis de solução aquosa. Apacame; 2000. Available from: <https://www.apacame.org.br/mensagemdoce/58/palestra.htm>.
119. De Zordi N, Cortesi A, Kikic I, Moneghini M, Solinas D, Innocenti G, et al. The supercritical carbon dioxide extraction of polyphenols from Propolis: A central composite design approach. *The Journal of Supercritical Fluids*. 2014;95:491-8.
120. Biscaia D, Ferreira SRS. Propolis extracts obtained by low pressure methods and supercritical fluid extraction. *J Supercrit Fluids*. 2009; 51: 17-23.
121. Machado BAS, Barreto GA, Costa AS, Costa SS, Silva RPD, Silva DF, Brandão HN, Rocha JLC, Nunes SB, Umsza-Guez MA, Padilha FF. Determination of parameters for the supercritical extraction of antioxidant compounds from green propolis using carbon dioxide and ethanol as co-solvent. *PLoS ONE*. 2015; 11(1): e0145954.
122. Vargas ACd, Loguercio AP, Witt NM, Costa MMd, Silva MSe, Viana LR. Alcoholic propolis extract: antimicrobial activity. *Cienc Rural*. 2004;34(1):159-63.
123. Varnam AH, Evans MG. *Foodborne pathogens: an illustrated text*. St Louis: Moby-Year Book. 1991;209-234.
124. Holt JG, Krieg NR, Sneath PHA, Williams ST. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994;(9):787.
125. Brasil. Ministério da Saúde. Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Salmonella* spp.: diagnóstico laboratorial do gênero *Salmonella*; 2011. Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2014/dezembro/15/manual-diagnostico-salmonella-spp-web.pdf>.
126. Trubulsi LR. *Microbiologia*. São Paulo (Atheneu), 2005.

127. Gorzynski EA. Enterobacteriaceae e Vibrionaceae. In: Nisengard RJ; Newman MG. Microbiologia oral e imunologia. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro/ RJ. 1997;(2):154-165.
128. Campos LC. Microbiologia. São Paulo, Atheneu, 2005.
129. ICMSF. Microorganisms in foods 5. Microbiological specifications of food pathogens. London, Blackel Academic & Professional. 1996;513.
130. Darwin KH, Miller VL. Molecular Basis of the Interaction of Salmonella with the Intestinal Mucosa. Clinical Microbiology Reviews. 1999;12(3):405-28.
131. 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)
132. USDA. Broiler Meat Production – Selected Countries Summary. United States Department of Agriculture; 2018. [acesso 20 de jul de 2019] Disponível em: <https://apps.fas.usda.gov/psdonline/report>
133. ABPA. Relatório anual. Associação Brasileira de Proteína Animal. 2014. [acesso 20 de jul 2019] Disponível em: <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais>.
134. Back A, Ishizuka MM. Micoplasmose aviária. In: Salmonelose aviária. Principais doenças de notificação obrigatória da Organização Mundial de Saúde animal. 2010;190-238.
135. Muniz, EC. Atualidades no estudo das salmoneloses aviárias. XIII Simpósio Brasil Sul De Avicultura E Iv Brasil Sul Poultry Fair, Chapecó. Núcleo Oeste de médicos veterinários e zootecnistas. Concórdia: Embrapa Suínos e Aves. 2012;13-26.
136. Gast RK. Salmonella infections, in: Swayne DE, Glisson JR, McDougald LR, Nolan LK, Suarez DL, Nair VL, Disease of Poultry, Wiley-Blackwell, Hoboken, 2013:677–736.
137. Carvalho ACFB, Cortez ALL. *Salmonella* spp. em carcaças, carne mecanicamente separada, lingüiças e cortes comerciais de frango. Ciência Rural. 2005;35(6):1465-1468.
138. Kasnowski MC, Mantilla SPS, Oliveira LAT, Franco RM. Formação de biofilme na indústria de alimentos e métodos de validação de superfícies. Rev Cient Elet de Med Vet. 2010;(15).
139. Cardoso ALSP, Kanashiro AMI, Stoppa GFZ, De Castro AGM, Luciano RL, Tessari ENC. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frango provenientes de abatedouros do estado de São Paulo, Brasil, no período de 2000 a 2010. 2015;(24).
140. Baptista DQ, Santos AFM, A MC, 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. Pesq Vet Bras. 2018;38(7):1278-1285.
141. Von Rückert DAS, Pinto PSA, Santos BM, Moreira MAS, Rodrigues ACA. Pontos críticos de controle de *Salmonella* spp. no abate de frangos. Arq Bras de Med Vet e Zootec. 2009;61(2):326-330. <https://dx.doi.org/10.1590/s0102-09352009000200007>
142. Borsoi A, Moraes HLS, Salle CTP, Nascimento VP. Número mais provável de *Salmonella* isoladas de carcaças de frango resfriadas. Ciênc Rural. 2010;40(11):2338-2342.
143. Lúcio CJ, Bittencourt MJ, Júnior MLC, Flores JVS, Teixeira MXA. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken feces in the central region of the state of Minas Gerais, Brazil. Rev de Patolog Tropical. 2019;48(2):79-86.
144. Moreira GN, Rezende CSM, Carvalho RN, Mesquita SQPM, Oliveira NA, Arruda MLT. Ocorrência de *Salmonella* sp. em carcaças de frangos abatidos e comercializados em municípios do estado de Goiás. Revista do Instituto Adolfo Lutz. 2008;67(2):126-130.

145. Boni HFK, Carrijo AS, Fascina VB. Ocorrência de *Salmonella* spp. em aviários e abatedouro de frangos de corte na região central de Mato Grosso do Sul. Ver Bras de Sal e Prod Anim. 2011;12(1).
146. 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 do Instituto Biológico. 2015;82.
147. Cardoso MO, Ribeiro AR, Santos LR, Pilotto F, Moraes HLS, Salle CTP. Antibiotic resistance in *Salmonella* Enteritidis isolated from broiler carcasses. Braz. J. Microbiol. 2006;37(3):368-371.
148. Duarte DAM, Ribeiro AR, Vasconcelos AMM, Santos SB, Silva JVD, Andrade PLA, Falcão LSPCA. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. Braz J Microbiol. 2009;40:569-573.
149. Souza RB, Ferrari RG, Magnani M, Kottwitz LBM, Alcocer I, Tognim MCB, Oliveira TCRM. Ciprofloxacin susceptibility reduction of *Salmonella* strains isolated from outbreaks. Braz Jour of Microb. 2010;41(1):497-500.
150. Brito DAP, Souza M, Saito AM, Menck MF, Oba A, Baptista AAS. Perfil de resistência a antimicrobianos de diferentes sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola. Revis de Ciênc Vet e Saúde Públ. 2016;3:191-194.
151. Minharro S, Nascimento CA, Galletti JP, Merisse TJ, Feitosa ACF, Santos HD, Dias FEF, Santana ES, Baldani CD, Andrade MA. Susceptibilidade antimicrobiana de sorovares de *Salmonella* sp. isolados de vísceras comestíveis e carcaças de aves abatidas no estado do Tocantins, Brasil. Semina: Ciênc Agrár. 2015;36(4).
152. Woisky RG et al. Analysis of propolis: Some parameters and procedures for chemical quality control. Journal Apic Research. 1998;37(2):99-105.
153. Molyneux P. The use of the stable free radical diphenylpicryl- hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarín Jour of Sci and Techno. 2004;26(2).
154. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Wayne, PA: NCCLS; 2000;5.
155. 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.
156. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard M02-A11. 11th ed. 2012;32(1):1-76.
157. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fourth Informational Supplement M100-S24. 2014; 34(1): 1-230.
158. Reverchon E, Marco I. Supercritical fluid extraction and fractionation of natural matter. J. Supercrit. Fluids. 2006; 38(2): 146-166. doi: 10.1016/j.supflu.2006.03.020
159. 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 própolis. Food Chemistry. 2012;131:645-651.
160. Salgueiro FB, Castro RN. Comparação entre a composição química e capacidade antioxidante de diferentes extratos de própolis verde. Quim Nova. 2016;39(10).
161. Castro ML, Cury JA, Rosalen PL, Alencar SM, Ikegaki M, Duarte S. & Koo H. Própolis do sudeste e nordeste do Brasil: influência da sazonalidade na atividade antibacteriana e composição fenólica. Quím. Nova. 2007;30(7):1512-1516.

162. Cabral ISR., Oldoni TLC, Prado A, Bezerra RMN, Alencar SM, Ikegaki M. & Rosalen P.L. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. *Quím. Nova.* 2009;32(6):1523-1527.
163. Da Silva ECC, Muniz MP, Nunomura RCS, Nunomura SM. & Zilse GAC. Constituintes fenólicos e atividade antioxidante da geoprópolis de duas espécies de abelhas sem ferrão amazônicas. *Quim. Nova.* 2013;36(5):628-633.
164. 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.
165. 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.
166. Fujimoto G. Própolis verde: Caracterização, potencial de atividade antimicrobiana e efeitos sobre biofilmes de *Enterococcus* spp. [Tese]. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade Engenharia de Alimentos; 2016.
167. Przybylek I, Karpinski TM. Antibacterial Properties of Propolis. *Molecules.* 2019;24(11):E2047.
168. Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol.* 2005;99(1):69-73.
169. 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.
170. Júnior AF, Lopes MMR, Colombari V, Monteiro ACM, Vieira EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Ciênc Rur.* 2006;36(1):294-7.
171. 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.
172. Orsi RO, Sforzin JM, Funari SRC, Fernandes-Jr. A, Rodrigues P, Bankova V. Effects of propolis from Brazil and Bulgaria on *Salmonella* serovars. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 2007;13(4):748-757.
173. Kalia P, Kumar NR, Harjai K. Efficacy of different extracts of propolis against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium; *In vitro* and *in vivo* study. *J Appl Nat Sci.* 2017;9(1):144-9.
174. 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 the Región del Maule, Central Chile. *Molecules.* 2015;20(10):18144-167.
175. Pereira DS, Abrantes MR, Coelho WAC, Freitas MO, Freitas CIA, Silva JBA. Potencial antibiótico da própolis apícola Potiguar em bactérias de importância veterinária. *Rev Verde de Agro e Desenv Sust.* 2016;11(3):151-158.
176. 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.
177. Santos DMSS, Berchieri Júnior A, Fernandes AS, Tavechio AT, Amaral LA. *Salmonella* em carcaças de frango congeladas. *Pesq Veterin Bras.* 2000;20(1).

178. Souza RB, Ferrari RG, Magnani M, Kottwitz LBM, Alcocer I, Tognim MCB, Oliveira TCRM. Ciprofloxacin susceptibility reduction of *Salmonella* strains isolated from outbreaks. *Braz Jour of Microbiol.* 2010;41(1):497-500.
179. Ribeiro AR, Kellermann A, Santos LR, Fittél AP, Nascimento VP. Resistência antimicrobiana em *Salmonella enterica* subsp. *Enterica* sorovar Hadar isoladas de carcaças de frango. *Arquiv do Instit Biológ.* 2006;73(3):357-360.
180. Cardoso MO, Ribeiro AR, Santos LR, Pilotto F, Moraes HLS, Salle CTP, Rocha SLS, Nascimento VP. Antibiotic resistance in *Salmonella Enteritidis* isolated from broiler carcasses. *Braz Jour of Microbiol.* 2006;37:299-302.
181. Dutil L. Ceftiofur resistance in *Salmonella enterica* serovar heidelberg from chicken meat and humans, Canada. *Emerg Infec Dis.* 2010;16(1):48-54.
182. 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
183. Duarte DAM, Ribeiro AR, Vasconcelos AMM, Santos SB, Silva JVD, Andrade PLA, Falcão LSPCA. Occurrence of *Salmonella* spp. in broiler chicken carcasses and their susceptibility to antimicrobial agents. *Braz Jour of Microb.* 2009;40:569-573.
184. 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.
185. Mahmoud UT, Abdel-Rahman MAM, Darwish MHA, Applegate TJ, Cheng HW. Behavioral changes and feathering score in heat stressed broiler chickens fed diets containing different levels of propolis. *Applied Animal Behaviour Science.* 2015;166:98-105.
186. Araujo JM, Carvalho MS. Fabricação de produto a base de própolis no combate a formação de biofilme microbiológico na indústria de alimentos. 2015;5(1).