

UFRRJ

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM
CIÊNCIA, TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM
AGROPECUÁRIA**

TESE

**Avaliação da atividade antibacteriana de Isatina,
outros derivados, extratos de espécies vegetais em
linhagens de *Campylobacter* spp.**

Claudia Bastos Barroso

2022



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PRO-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E
INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DE ISATINA,
OUTROS DERIVADOS, EXTRATOS DE ESPÉCIES VEGETAIS EM
LINHAGENS DE *CAMPYLOBACTER* SPP.**

CLAUDIA BASTOS BARROSO

Sob a orientação da Professora
Aurea Echevarria Aznar Neves Lima

e Co-orientação da Professora
Liliane Miyuki Seki

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora, no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, Área de Concentração em Patobiologia Animal.

Seropédica, RJ
Dezembro de 2022

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central/ Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pela autora

B615a Barroso, Claudia Bastos, 1969-
Avaliação da atividade antibacteriana de Isatina,
outros derivados, extratos de espécies vegetais em
linhagens de Campylobacter spp. / Claudia Bastos
Barroso. - Rio de Janeiro, 2022.
63 f.: il.

Orientadora: Aurea Echevarria Aznar Neves Lima.
Coorientadora: Liliane Miyuki Seki.
Tese(Doutorado). -- Universidade Federal Rural do
Rio de Janeiro, PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA,
TECNOLOGIA E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA, 2022.

1. Isatina. 2. Atividade antibacteriana. 3.
Extratos vegetais . 4. Campylobacter spp.. I. Lima,
Aurea Echevarria Aznar Neves, 1950-, orient. II.
Seki, Liliane Miyuki, 1971-, coorient. III
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA E
INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA. IV. Título.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

É permitida a cópia parcial ou total desta Tese, desde que seja citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA, TECNOLOGIA
E INOVAÇÃO EM AGROPECUÁRIA



HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO Nº 25 / 2022 - PPGCTIA (12.28.01.84)

Nº do Protocolo: 23083.077091/2022-18

Seropédica-RJ, 20 de dezembro de 2022.

CLAUDIA BASTOS BARROSO

Tese submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Doutora** no Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária, área de concentração em Sanidade Animal e Vegetal.

TESE APROVADA EM 14/12/2022

Aurea Echevarria Aznar Neves Lima. Dra. UFRRJ
(Orientadora)

Liliane Miyuki Seki. Dra. Fiocruz
(Coorientadora)

Maria Aparecida M. Maciel. Dra. UFRN

Sheila da Silva Duque. Dra. FIOCRUZ

Lilia Aparecida Salgado Morais. Dra. EMBRAPA

Marcia Cristina Campos de Oliveira. Dra. UFRRJ

(Assinado digitalmente em 20/12/2022 14:43)
AUREA ECHEVARRIA AZNAR NEVES LIMA
PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: 387189

(Assinado digitalmente em 20/12/2022 16:40)
MARCIA CRISTINA CAMPOS DE OLIVEIRA
CHEFE DE DEPARTAMENTO - TITULAR
DQO (11.39.00.23)
Matrícula: 2181682

(Assinado digitalmente em 02/01/2023 10:02)
MARIA APARECIDA MEDEIROS MACIEL
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 373.201.654-49

(Assinado digitalmente em 21/12/2022 10:11)
LILIA APARECIDA SALGADO DE MORAIS
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 025.802.007-54

(Assinado digitalmente em 22/12/2022 09:33)
LILIANE MIYUKI SEKI
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 012.188.797-93

(Assinado digitalmente em 21/12/2022 16:26)
SHEILA DA SILVA DUQUE
ASSINANTE EXTERNO
CPF: 068.971.717-27

Visualize o documento original em <https://sipac.ufrj.br/public/documentos/index.jsp>
informando seu número: **25**, ano: **2022**, tipo: **HOMOLOGAÇÃO DE TESE DE DOUTORADO**, data
de emissão: **20/12/2022** e o código de verificação: **27cd570369**

DEDICATÓRIA

Dedico essa tese ao meu pai Ary Barroso (*in memoriam*), a minha mãe Conceição de Maria Bastos Barroso e ao meu irmão Wendell Bastos Barroso, por darem mais sentido à minha vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo privilégio desta conquista, porque estando com ele tudo posso.

A minha orientadora Dra. Aurea Echevarria Azenar Neves Lima e minha coorientadora Liliane Miyuki Seki, incansáveis nas orientações, ensinamentos, carinho e atenção.

Aos professores Carlos Zarden Feitosa de Oliveira, Lilia Aparecida Salgado Moraes, Marcia Cristina Campos de Oliveira, Sheila da Silva Duque, Irene da Silva Coelho e Gerson Silva de Lima que aceitaram participar da banca examinadora desta tese.

À Maurício Zuma, diretor do Instituto de Tecnologia em Imunodiagnóstico (Bio-Manguinhos/Fiocruz - RJ), ao atual por permitir o acesso aos departamentos para a realização desta tese.

À Edimilson Domingos da Silva, gerente do LATED/Bio-Manguinhos, a Keila Gisele pela valiosa colaboração e pela disponibilização do laboratório para a realização deste estudo.

À Michele Cardoso do Nascimento, Carlos José da Silva, Lucio de Barros Garcia e equipe da Seção de Controle de Banco de Células (SBCEL) - (Bio-Manguinhos/Fiocruz - RJ)

À Patrícia Alves, Jarbas Emílio dos Santos e equipe do Departamento de Imunologia (INCQS/Fiocruz)

À equipe do Laboratório de Zoonoses Bacterianas/Setor de *Campylobacter* do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz - RJ pela colaboração primorosa colaboração e disponibilização do laboratório para a realização dos ensaios microbiológicos para o estudo.

À Direção da Escola Nacional de Saúde Pública Sérgio Arouca e o Departamento de Ciências Biológica pelo apoio recebido na fase final deste estudo.

Aos meus chefes Dr. Antonio Teva, Dr. Raimundo Wilson de Carvalho, pela autorização para a realização das atividades envolvidas na finalização deste estudo.

Aos amigos do Departamento de Ciências Biológicas ENSP/Fiocruz pelo apoio e incentivo.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência, Tecnologia e Inovação em agropecuária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro pela oportunidade do desenvolvimento desse estudo.

Aos amigos de Bio-Manguinhos pelo apoio de sempre em todos os momentos que precisei.

Ao meus pais e meu irmão, pelo amor, compreensão, carinho, incentivo, valores e determinação para concretizar os sonhos.

Ao apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES).

RESUMO

BARROSO, Claudia Bastos. **Avaliação da atividade antibacteriana de isatina, outros derivados e extratos de espécies vegetais em linhagens de *Campylobacter* spp.** 2022. 63 f. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária). Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2022.

Campylobacter é um importante patógeno zoonótico, distribuído mundialmente, e causador de gastroenterites em humanos transmitido por alimentos (Campilobacteriose). Nesse sentido, as pesquisas com *Campylobacter* sp. em carnes de frango assumem relevância no Brasil, devido a sua atuação como o maior exportador mundial. Isto é agravado, quando a antibioticoterapia se faz necessária e o *Campylobacter* já tem desenvolvido vários mecanismos de resistência antimicrobiana. Na lista da OMS, o *Campylobacter* é um dos patógenos de alta prioridade para o desenvolvimento de novas alternativas aos antimicrobianos já existentes. Assim, as plantas medicinais são alternativas relevantes para o uso em alimentos ou como controle de agentes patogênicos, devido a sua alta potência e efeitos colaterais reduzidos. Com este objetivo foram estudadas 39 amostras, dentre elas extratos vegetais brutos e frações, isatina comercial, óleos fixos, produtos naturais isolados e derivados sintéticos como possíveis agentes antibacterianos frente a linhagens de *Campylobacter* spp. A metodologia usada para a triagem das amostras foi o teste de disco-difusão. As amostras foram submetidas as cepas de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, utilizadas como padrão do teste disco-difusão, e *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. Os resultados mostraram que das 39 amostras avaliadas, apenas a isatina, mostrou atividade antibacteriana frente a cepa de *C. jejuni* ATCC. A partir do resultado satisfatório obtido com a isatina foi determinada a Concentração Mínima Inibitória (MIC) pela técnica de microdiluição em microplaca em 30 linhagens de *Campylobacter* spp. selecionadas na coleção de CCAMP, incluindo a cepa padrão *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. Dentre as linhagens de *Campylobacter* analisadas, verificou-se que o MIC=8 µg/mL foi encontrado em 76% (23) das cepas testadas, o MIC=16 µg/mL foi encontrado em 17% (5) das cepas, e 7% (2) apresentaram MIC<1 µg/mL. Já as Concentrações Bactericidas Mínimas (MBC) mostraram que 73% (22) das cepas apresentaram MBC= 16 µg/mL, 20% (6) com MBC=8,0 µg/mL e 7% (2) com MBC <1,0 µg/mL. O teste de citotoxicidade para determinar o valor de IC₅₀ em células normais da linhagem MRC-5 apresentou-se satisfatório até a concentração de 128 µg/mL. Este estudo demonstra o potencial da atividade da isatina em relação as espécies de *Campylobacter*, onde concentrações muito baixas desta substância foram capazes de agir frente as bactérias deste gênero. Vários autores estudam a relação de extratos, óleos essenciais e derivados isolados de plantas frente a diversas bactérias patogênicas, mas em relação ao *Campylobacter*, esse estudo é inexistente. Os resultados encontrados apontam para a necessidade de aprofundar as pesquisas não só com a isatina mas, também, procurar opções de novas substâncias com potencial atividade para o controle de infecções bacterianas, além de redução dos efeitos colaterais apresentados pelos antibióticos de uso clínico.

Palavras-chave: Isatina. Atividade antibacteriana. Extratos vegetais. *Campylobacter* spp.

ABSTRACT

BARROSO, Claudia Bastos. **Evaluation of the antibacterial activity of isatin, other derivatives and extracts of plant species in *Campylobacter* spp strains.** 2022. 63 p. Thesis (Doctorate degree in Science, Technology and Innovation in Agriculture). Dean of Research and Graduate studies, Federal Studies, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, 2022.

Campylobacter is an important zoonotic pathogen, distributed worldwide, and the cause of foodborne gastroenteritis in humans (Campylobacteriosis). In this sense, research with *Campylobacter* sp. in chicken meat takes on relevance in Brazil, due to its role as the world's largest exporter. This is aggravated when antibiotic therapy is necessary, and *Campylobacter* has already developed several mechanisms of antimicrobial resistance. On the WHO list, *Campylobacter* is one of the high priority pathogens for the development of new alternatives to existing antimicrobials. Thus, medicinal plants are relevant alternatives for use in food or as pathogen control, due to their high potency and reduced side effects. With this objective, 39 samples were studied, including crude plant extracts and fractions, commercial isatin, fixed oils, isolated natural products, and synthetic derivatives as possible antibacterial agents against strains of *Campylobacter* spp. The methodology used for screening the samples was the disk-diffusion test. The samples were subjected to strains of *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922, used as standard for the disk-diffusion test, and *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. The results showed that of the 39 samples evaluated, only isatin showed antibacterial activity against the strain of *C. jejuni* ATCC. Based on the satisfactory result obtained with isatin, the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) was determined using the microdilution technique in microplates in 30 strains of *Campylobacter* spp. selected from the CCAMP collection, including the standard strain *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. Among the strains of *Campylobacter* analyzed, it was found that MIC=8 µg/mL was found in 76% (23) of the tested strains, MIC=16 µg /mL was found in 17% (5) of the strains, and 7% (2) had MIC<1 µg/mL. The Minimum Bactericidal Concentrations (MBC) showed that 73% (22) of the strains had MBC=16 µg/mL, 20% (6) with MBC=8.0 µg/mL and 7% (2) with MBC <1, 0 µg/mL. The cytotoxicity test to determine the IC50 value in normal cells of the MRC-5 lineage was satisfactory up to a concentration of 128 µg/mL. This study demonstrates the potential of isatin activity in relation to *Campylobacter* species, where very low concentrations of this substance were able to act against bacteria of this genus. Several authors study the relationship of extracts, essential oils and derivatives isolated from plants against different pathogenic bacteria, but in relation to *Campylobacter*, this study is non-existent. The results found point to the need to deepen research not only with isatin but also to look for options for new substances with potential activity for the control of bacterial infections, in addition to reducing the side effects presented by antibiotics for clinical use.

Keywords: Isatin. Antibacterial activity. Plant extracts. *Campylobacter* spp.

RESUMEN AMPLIADO

BARROSO, Claudia Bastos. **Evaluación de la actividad antibacteriana de isatina, otros derivados y extractos de especies vegetales en cepas de *Campylobacter* spp.** 2022. 63 h. Tesis (Doctorado en Ciencia, Tecnología e Innovación en la Agricultura). Decano de Investigación y Estudios de Posgrado, Universidad Federal de Rio de Janeiro, Seropédica, 2022.

1. Introducción

Campylobacter es un patógeno zoonótico importante, distribuido en todo el mundo, que causa gastroenteritis en humanos transmitida por los alimentos (campylobacteriosis). En este sentido, la investigación con *Campylobacter* sp. en carne de pollo cobran relevancia en Brasil, debido a su rol como el mayor exportador mundial. Esto se ve agravado por la llegada de la multirresistencia a los antimicrobianos, que aumenta la necesidad de buscar nuevas alternativas a los antimicrobianos existentes. Así, las plantas medicinales son alternativas relevantes para su uso en alimentos o como control de patógenos, debido a su alta potencia y efectos secundarios reducidos. Además, la isatina y sus derivados se han mostrado en la literatura con un amplio perfil farmacológico (Figura 1).

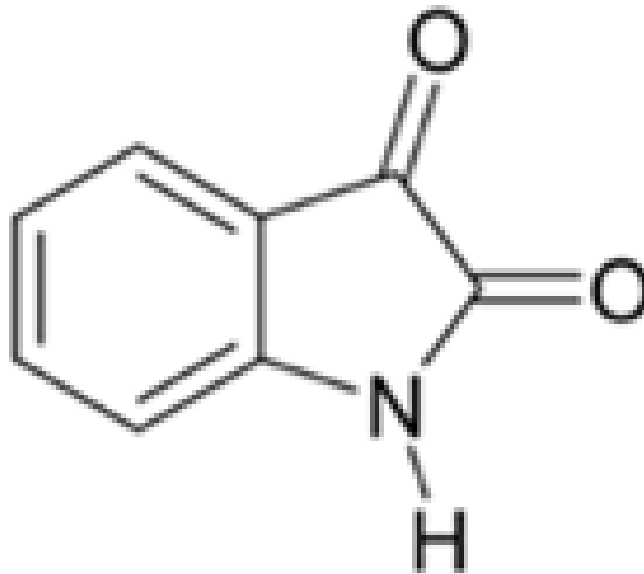


Figura 1. Estructura de la isatina (1H-indol-2,3-diona). Fuente: SILVA, 2018.

2. Material y Métodos

Se estudiaron 39 muestras, entre extractos, aceites fijos, productos naturales aislados y derivados sintéticos como posibles agentes antimicrobianos frente a cepas de *Campylobacter* spp. La metodología utilizada para ensayar las muestras fue la metodología del Disco-Difusión, según el método de Kirby-Bauer. Las muestras se evaluaron contra las cepas *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 y *Campylobacter jejuni* ATCC 33560.

En la Tabla 1 se muestra el listado de cepas de *Campylobacter*, su origen, lugar y fecha de aislamiento, trabajadas en esta etapa y que fueron donadas por la Colección *Campylobacter* (CCAMP), del Instituto Oswaldo Cruz / FIOCRUZ.

Tabla 1. Lista de cepas donadas de la colección *Campylobacter* (CCAMP). Fuente: Laboratorio de Zoonosis Bacterianas / Colección *Campylobacter* del Instituto Oswaldo Cruz

	No. CCAMP	Fecha de aislamiento	Local	Origen	Especie
1	1553	1980	USA	animal	<i>C. jejuni</i>
2	499	1999	RJ	humana	<i>C. jejuni</i>
3	1504	2007	RJ	animal	<i>C. coli</i>
4	1505	2007	RJ	animal	<i>C. coli</i>
5	1507	2007	RJ	animal	<i>C. coli</i>
6	1509	2007	RJ	animal	<i>C. coli</i>
7	1510	2007	RJ	animal	<i>C. coli</i>
8	1023	2008	RJ	comida	<i>C. jejuni</i>
9	1051	2009	RJ	comida	<i>C. coli</i>
10	1052	2009	RJ	comida	<i>C. coli</i>
11	1057	2009	RJ	comida	<i>C. coli</i>
12	1477	2009	RJ	humana	<i>C. jejuni</i>
13	1062	2010	RJ	comida	<i>C. coli</i>
14	1064	2010	RJ	comida	<i>C. coli</i>
15	1067	2010	RJ	comida	<i>C. coli</i>
16	1490	2011	RJ	humana	<i>C. jejuni</i>
17	1519	2014	RS	comida	<i>C. jejuni</i>
18	1520	2014	RS	comida	<i>C. jejuni</i>
19	1521	2014	RS	comida	<i>C. jejuni</i>
20	1523	2014	RS	comida	<i>C. jejuni</i>
21	1536	2014	RS	comida	<i>C. jejuni</i>
22	1543	2014	RS	comida	<i>C. jejuni</i>
23	1547	2014	RS	comida	<i>C. jejuni</i>
24	1549	2014	RS	comida	<i>C. jejuni</i>
25	1552	2014	RS	comida	<i>C. jejuni</i>
26	1499	2015	RJ	humana	<i>C. jejuni</i>
27	1538	2015	RS	animal	<i>C. jejuni</i>
28	1554	2015	RJ	animal	<i>C. coli</i>
29	1555	2015	RJ	animal	<i>C. jejuni</i>
30	1574	2016	RJ	animal	<i>C. jejuni</i>

Después de preparar las microplacas y agregar el microorganismo, se homogeneizó el contenido con movimientos circulares durante 1 minuto antes de incubar a 37 °C durante 24/48 h, en un frasco con atmósfera microaerófila. Ensayos de microdilución en caldo fueron

realizados por triplicado. La atmósfera microaerófila se elaboró utilizando la envoltura Gaspak EZ Campy, de Becton Dickinson®.

3. Resultados y Discusión

Los resultados mostraron que, de las 39 muestras evaluadas, solo la isatina mostró actividad antibacteriana contra la cepa *C. jejuni* ATCC probada. Aunque varias referencias bibliográficas ya han estudiado la relación de extractos, aceites esenciales y derivados aislados de plantas frente a varias bacterias patógenas, en relación con *Campylobacter*, este estudio es inexistente.

A partir del resultado satisfactorio obtenido con isatina, se realizó la determinación de Concentración Mínima Inhibitoria en microplaca contra las cepas de *Campylobacter* seleccionadas en la colección CCAMP, incluyendo la cepa *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. Entre las bacterias analizadas, se verificó que la CIM = 8 µg/mL se encontró en el 73% (22) de las cepas analizadas, incluida *C. jejuni* ATCC 33560. La MIC = 16 µg/mL se encontró en el 13% de las cepas, y el 7% tuvo MIC = 4.0 µg/mL y MIC < 1 µg/ml cada uno.

Los extractos y fracciones de las especies descritas y analizadas *Kalonchoe brasilienses* (Crassulaceae), *Pyostegia venusta* (Bignoceaceae), *Ulva fasciata* - R6 (extracto crudo caliente sin el polisacárido de ulvana) y *Ulva fasciata* - R7 (fracción lipídica) presentaron grandes zonas de inhibición. Sin embargo, también hubo un crecimiento, en la parte interna del halo, de algunas 'colonias satélites'. La presencia de estas 'colonias satélites' de *Campylobacter* en la zona de inhibición del crecimiento indica que algunas células mutantes resisten a la acción de estos extractos utilizados.

Tabla 2. Resultados obtenidos para el efecto antimicrobiano de extractos de *Kalonchoe brasilienses* (Crassulaceae), *Pyostegia venusta* (Bignoceaceae), *Ulva fasciata* - R6 (extracto crudo caliente sin el polisacárido de ulvana) y *Ulva fasciata* - R7 (fracción lipídica). Fuente: LABZOO/CCAMP

Extractos	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. jejuni</i>
	ATCC25922	ATCC25923	ATCC 33560
	Halo de inhibición (mm)		
<i>Kalonchoe brasilienses</i>	No	No	19
<i>Pyostegia venusta</i>	No	No	24
R6 - extracto caliente crudo de <i>Ulva fasciata</i>	No	No	15
R7 – fracción lipídica de <i>Ulva fasciata</i>	No	No	13
Solución dimetilsulfóxido al 1% v/v (control Negativo)	No	No	No
Disco comercial de Ciprofloxacina a 5µg/mL (control positivo)	Sí	sí	24

Considerando el potencial de actividad antimicrobiana ya reportado en la literatura (GARG et al., 1992; SILVA, 2007; PURABI et al., 2012) para las especies *Pyostegia venusta*, *Kalonchoe brasilienses* y *Ulva fasciata*, sus extractos fueron seleccionados para ser analizados mediante la metodología de difusión en disco contra las bacterias *S. aureus* ATCC25922, *E. coli* ATCC25923 y *C. jejuni* ATCC 33560.

La Concentración Mínima Inhibitoria (MIC) se definió como la concentración más baja de isatina en µg/mL capaz de prevenir el crecimiento de la cepa de *Campylobacter* estudiada. Por lo tanto, la determinación de la MIC tuvo como objetivo evaluar cuantitativamente el

potencial antibacteriano de la isatina en cepas aisladas de *Campylobacter* con diversas características, incluidas las cepas con resistencia a múltiples fármacos antimicrobianos. Los resultados de la CIM de isatina demuestran que la concentración de hasta 8 µg/mL de isatina fue capaz de inhibir el crecimiento del 83% de las cepas de *Campylobacter* analizadas, incluso aquellas con resistencia a antibióticos como tetraciclina, ciprofloxacina y eritromicina, siendo la eritromicina la última opción para el tratamiento clínico en casos severos con *Campylobacter*. El resto del 17% de las cepas estudiadas que presentaron CIM=16 µg/mL, de origen humano y alimentario, incluso con una CIM ligeramente superior, también mostró un resultado satisfactorio en cuanto a su efecto anti-*Campylobacter*.

La Concentración Bactericida Mínima (MBC) se determinó a partir de los pocillos en los que no había crecimiento bacteriano visible, en la prueba MIC previa a la adición del revelador INT. MBC se definió como la concentración más baja de isatina en el estudio capaz de causar la muerte de *Campylobacter*. Los resultados de MBC mostraron que el 73 % (22/30) de las cepas tenían MBC=16 µg/mL, el 20 % (6/30) tenían MBC=8,0 µg/mL y el 7 % (2/30) tenían MBC <1,0 µg/mL). Entre las 22 cepas que presentaron MBC=16 µg/mL, 9 de estas fueron aisladas entre 1999 y 2015, tanto en Rio de Janeiro como en Rio Grande do Sul, de diferentes fuentes (animal, alimenticia y humana) siendo resistentes a ciprofloxacina, eritromicina y tetraciclina simultáneamente. Otras 4 cepas, todas de Río de Janeiro, fueron sensibles a los antibióticos probados, aisladas en 1980 y 2009. Y otras 4 cepas fueron resistentes a ciprofloxacina y eritromicina, todas ellas aisladas en 2014 en Rio Grande do Sul. Resistentes solo a la ciprofloxacina fueron 3 cepas, en 2015 y 2016, 2 de Rio de Janeiro y 1 de Rio Grande do Sul, todas de origen animal. Y resistentes a ciprofloxacina y tetraciclina hubo 2 cepas transmitidas por alimentos y una cepa humana en 2008 y 2011, respectivamente. Los resultados de MBC demostraron que una concentración de isatina de 16 µg/mL sería suficiente para matar el 100 % de las células de *Campylobacter*.

Con base en los prometedores resultados de la MIC y MBC de isatina contra *Campylobacter*, continuamos nuestro estudio con el fin de verificar el cálculo de la concentración inhibitoria media de isatina (IC₅₀) en células normales del linaje MRC-5, determinando el nivel de su citotoxicidad. Al evaluar el efecto de la isatina contra el linaje MCR5 de células normales, el parámetro de citotoxicidad mostró que esta sustancia tiene potencial para ser utilizada en medicina clínica, luego de estudios adicionales.

4. Conclusiones

Este estudio demuestra el potencial de actividad de la isatina en relación con la especie *Campylobacter*, donde concentraciones muy bajas de esta sustancia fueron capaces de actuar contra bacterias de este género. Los resultados parciales encontrados apuntan a la necesidad de profundizar la investigación no solo con isatina, sino también de buscar opciones de nuevas sustancias con potencial para controlar infecciones bacterianas, además de reducir los efectos secundarios que presentan los antibióticos para uso clínico.

Palabras clave: Actividad antimicrobiana. Extractos de plantas. *Campylobacter* spp.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Formato de células de *Campylobacter jejuni*, espiral característica e estruturas relacionadas obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Fonte: <https://about-campylobacter.com/> 4
- Figura 2.** Estruturas químicas dos antibióticos utilizados em clínica para o tratamento de *Campylobacter* spp, os quais já encontramos isolados resistentes.....7
- Figura 3.** Estruturas químicas dos antibióticos, os quais isolados de *Campylobacter* já apresentam mecanismos de resistência.....8
- Figura 4.** Estrutura da Isatina (1H-indol-2,3-diona). Fonte: SILVA, 2018. 14
- Figura 5.** *Couroupita guianensis* Aubl. A. Árvore; B. Cachos e flores. Fonte: a autora (2021). 14
- Figura 6.** Núcleo indol e suas principais atividades biológicas. Fonte: SHARMA et al., 2010 15
- Figura 7.** Estrutura do sunitinibe. Fonte: FAIVRE et al., 2007..... 15
- Figura 8.** A. Preparação das soluções para diluição das amostras em Cabine de Segurança Biológica; B. Criotubos para armazenamento. Fonte: LATED/BIO-MANGUINHOS... 19
- Figura 9.** Cepas padrão de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *C. jejuni* ATCC 33560 diluídas em solução salina na escala padrão do tubo 0,5 da escala de McFarland. Fonte: LABZOO/CCAMP..... 20
- Figura 10.** Semeadura de *Campylobacter jejuni* ATCC no meio MH acrescido de sangue. Fonte: LABZOO/CCAMP..... 21
- Figura 11.** Discos estéreis em placas de petri, onde foram depositados 20 µL de cada amostra que foi testada. Fonte: LABZOO/CCAMP. 22
- Figura 12.** A. Colocação dos discos impregnados com as substâncias testes. Fonte: LABZOO/CCAMP; B. Incubação da cepa de *Campylobacter* em jarra, com atmosfera de microaerofilia, a 42 °C por 48 h. Fonte: LABZOO/CCAMP..... 22
- Figura 13.** Esquema representativo do Teste de Microdiluição em Caldo, onde as colunas são as cepas 01, 02, 03 e 04 testadas, em triplicata. A concentração do extrato usado está representada. 24
- Figura 14.** Esquema representativo do Teste de Microdiluição em caldo, onde as colunas são exemplos das cepas de *Campylobacter* spp. testadas, em triplicata, com os controles nas colunas da direita. As concentrações utilizadas da isatina estão representadas pelas linhas. 25
- Figura 15.** Esquema representativo do Teste de Microdiluição em caldo, onde as colunas são exemplos das cepas de *Campylobacter* spp. testadas, em triplicata, com os controles nas colunas da direita. As concentrações utilizadas da isatina estão representadas pelas linhas.

Legenda: Controles positivos: Meio MH+ Bacteria e Meio MH + DMSO + Bactéria. Controles negativos: Meio MH+ Extrato diluído e só o Meio MH. Controle com antibiótico: Meio MH + Ciprofloxacina à 5 µg/mL mais Bactéria.	26
Figura 16. Jarra para incubação das microplacas de 96 poços, em atmosfera de microaerofilia. Fonte: LABZOO/CCAMP.....	27
Figura 17. A. Mostra como foi dividida a placa de Ágar MH acrescida de sangue com as concentrações referentes aos MICs, onde não houve turvação; B. Após incubação, o crescimento bacteriano foi observado na concentração de 8 µg/mL. Determinando que a MBC da isatina para esta cepa foi de 16 µg/mL.	27
Figura 18. Etapas da preparação das células para o experimento até a adição da isatina. A. Preparação das células MRC-5; B. Preparo das diluições e inoculação na célula MRC-5; C. Placas contendo a célula MRC-5; D. Placa após a inoculação das concentrações com isatina.....	28
Figura 19. Esquema da placa de 96 poços com a cultura de células em relação as concentrações da isatina e os controles branco e negativo. Legenda: BR-Branco; CN-controle negativo	29
Figura 20. Esquema da placa de 96 poços com a cultura de células em relação as concentrações dos controles positivo, negativo e o branco. Legenda: BR-branco; CN-controle negativo; CP-controle positivo	29
Figura 21. Placa de 96 poços após adição do vermelho neutro.....	30
Figura 22. O corante vermelho neutro se apresenta com a coloração rosa. A. Placa contendo SDS (controle positivo) após eluição; B. Placa contendo Isatina após eluição.....	31
Figura 23. Halos de inibição frente a cepa de <i>C. jejuni</i> (ATCC33560) nas amostras 1 e 4 correspondentes a isatina (IST), respectivamente. Fonte: LABZOO/CCAMP.....	32
Figura 24. “Colônias satélites” de <i>C. jejuni</i> que cresceram dentro do halo de inibição. Fonte: LABZOO/CCAMP	33
Figura 25. Ensaios de microdiluição em caldo frente a interação das cepas de <i>Campylobacter</i> spp. com as diluições de isatina. A leitura do MIC equivale a menor concentração onde houve a inibição do crescimento (ausência de cor rosa).	38
Figura 26. Mostram as placas de Ágar MH acrescidas de sangue com o crescimento bacteriano que foi observado na determinação da MBC. A. (CCAMP1538) apresentou MBC de 16 µg/mL; B. (ATCC 33560) apresentou MBC de 8 µg/mL; C. (CCAMP1062) o MBC foi de 8 µg/mL.	43
Figura 27. Morfologia celular após exposição de 48 horas. A. Controle de células íntegro e sem coloração; B. Corado com vermelho neutro; Isatina 1024 µg/mL; C. Sem coloração; D. Corado com vermelho neutro; Isatina 256 µg/mL; E. Sem coloração; F. Corado com vermelho neutro; Isatina 8 µg/mL; G. Sem coloração; H. Corado com vermelho neutro. Aumento 40X.	45

Figura 28. Viabilidade celular do controle positivo frente a linhagem celular MRC-5, onde: IC_{50} = concentração inibitória 50%; R^2 = fator de determinação; CI = intervalo de confiança de 95%.46

Figura 29. Viabilidade celular da isatina frente linhagem celular MRC-5.....47

Figura 30. Distribuição dos valores de IC_{50} para os experimentos com a isatina frente a linhagem celular MRC-5..48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de patógenos prioritários resistentes a antibióticos. Fonte: OMS, 2017.....	8
Tabela 2. Lista de plantas medicinais frente as espécies de <i>Campylobacter</i>	11
Tabela 3. Lista dos extratos, frações, óleos essenciais, substâncias naturais isoladas e sintéticas utilizados no estudo de triagem	18
Tabela 4. Relação das Cepas cedidas da coleção de <i>Campylobacter</i> (CCAMP) Laboratório de Zoonoses Bacterianas/ Coleção de <i>Campylobacter</i> do Instituto Oswaldo Cruz	23
Tabela 5. Resultados obtidos para o efeito antimicrobiano dos extratos de <i>Kalonchoe brasilienses</i> (<i>Crassulaceae</i>), <i>Pyostegia venusta</i> (<i>Bignoceaceae</i>), <i>Ulva fasciata</i> - R6 (extrato bruto à quente sem o polissacarídeo ulvana) e <i>Ulva fasciata</i> - R7 (fração lipídica) na concentração de 20 µg/mL	33
Tabela 6. Resultados das amostras contendo a isatina e seus derivados frente as bactérias padrões de ATCC de <i>S. aureus</i> , <i>E. coli</i> e <i>C. jejuni</i> na concentração de 20 µg/mL.....	34
Tabela 7. Leitura da densidade óptica dos controles usados no teste da MIC.....	39
Tabela 8. Leitura da Densidade Óptica (595 nanômetros) da MICs das linhagens de <i>Campylobacter</i>	40
Tabela 9. Relação dos resultados obtidos para as cepas de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> analisadas no teste para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) em microplaca com a isatina e Concentração Bactericida Mínima (MBC)	41
Tabela 10. Valores de IC50 (µg/mL) para isatina frente a linhagem celular MRC-5	47

LISTA DE QUADROS

- Quadro 1.** Esquema representativo da microplaca de 96 poços com os testes controles realizados, sem a isatina, a fim de verificar o crescimento do *Campylobacter* na presença dos reveladores INT e TTC e do volume do inóculo ideal de 5 µL ou 10 µL37

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

AAA	Ácido acetil aleiturólico (tripterpeno isolado)
ABPA	Associação Brasileira de Proteína Animal
ATCC®	Padrão da <i>American Type Culture Collection</i> (Coleção da Cultura Tipo Americana)
CCAMP	Coleção de <i>Campylobacter</i>
CLSI	<i>Clinical Laboratory Standard Institute</i> (Instituto de Padrões de Laboratório Clínico)
DCTN	<i>Trans</i> -desidrocootonina (diterpeno isolado)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DTAs	Doença transmitida por alimentos
EFSA	European Food Safety Authority (Autoridade Européia de Segurança Alimentar)
FAO	Food and Agriculture Organization (Organização para Alimentação)
FDA	Food and Drug Administration (Administração de Alimentos e Medicamentos)
IACG	Grupo de Coordenação Interagências
IC50	Concentração Inibitória
IES/ESP	Ensino Superior/Escolas de Saúde Pública
INT	2-p-iodophenyl-3p-nitrofenil-5-fenil tetrazolium cloridrato
LATED	Laboratório de Tecnologia Diagnóstica
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
MDR	Multidrogas Resistentes
MH	Ágar Mueller Hinton
MHB	Caldo Muller Hinton com bactéria.
MHB- TTC	Meio de cultura contendo caldo Muller Hinton, bactéria e TTC Cloridrato de tri-fenil-tretazolium
MHB	Meio de cultura contendo caldo Muller Hinton, bactéria e INT
MH-INT	Meio de cultura caldo Muller Hinton e INT
MH-TTC	Meio de cultura caldo Muller Hinton e TTC
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MØ	Inóculo diluído 1/10 Escala de MacFarland
MS	Ministério da Saúde
NA	Antimicrobianos naturais
nNA	Nanoencapsulado
OCDE	Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
OMS	Organização Mundial da Saúde
ONU	Organização das Nações Unidas
SAR	Relação estrutura-atividade
SENASA	Serviço Nacional de Saúde e Qualidade Agrícola de Alimentos
SUS	Sistema Único de Saúde
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
SWAB	Cotonete estéril
UFC	Unidade Formadora de Colônia
VNC	Viável, mas não cultivável

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
2	REVISÃO DE LITERATURA	3
	2.1 Histórico	3
	2.2 Características Descritivas do Gênero <i>Campylobacter</i>	3
	2.3 Epidemiologia	4
	2.4 Resistência Bacteriana	6
	2.5 Plantas Medicinais	10
	2.6 Isatina e seus Derivados com Atividade Biológica	13
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
	3.1 Equipamentos e Materiais	17
	3.2 Reagentes	17
	3.3 Local de Realização dos Experimentos	18
	3.4 Identificação das Espécies Vegetais e Preparação dos Extratos	18
	3.5 Solução de Estoque dos Extratos, Frações, Óleos Essenciais, Substâncias Isoladas e Sintéticas	19
	3.6 Método de Disco-Difusão Usado como Triagem para Observar a Ação Antibacteriana dos Extratos, Frações, Óleos Essenciais, Substâncias Naturais Isoladas e Sintéticas	19
	3.6.1. Cepas bacterianas escolhidas para o estudo de triagem	20
	3.6.2. Preparação da suspensão de cepas bacterianas	20
	3.6.3. Semeadura de suspensões bacterianas em placas com meio de cultura de Ágar Mueller Hinton (MH) acrescido de sangue	20
	3.6.4. Impregnação dos discos com as amostras e aplicação nas placas de ágar MH inoculadas com as bactérias	21
	3.7 Teste para a Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)	23
	3.7.1 Teste de microdiluição em caldo	23
	3.8 Teste para a Determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC)	27
	3.9 Avaliação da Citotoxicidade <i>In Vitro</i> por Captação de Vermelho Neutro Utilizada para Determinação do IC ₅₀	28
	3.10 Local e Preparação das Células	28
	3.11 Concentração da Isatina e Controles Utilizados	28
	3.12 Tempo de Exposição da Isatina e Preparo das Células Para a Eluição com o Corante	30
	3.13 Leitura das Absorbâncias e Cálculo dos Valores do IC ₅₀	30
	3.14 Análise Estatística	31
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
	4.1 Teste de Triagem (Método de Disco-Difusão)	32
	4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC)	36
	4.3 Avaliação da Citotoxicidade <i>In Vitro</i> por Captação de Vermelho Neutro utilizada para Determinação do IC ₅₀ frente a Linhagem de MRC-5	44
5	CONCLUSÕES	49
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	50
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1 INTRODUÇÃO

A produção e exportação de proteína animal representa grande importância no desenvolvimento social e econômico do Brasil. Os dados da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) mostraram que o Brasil, em 2020 permaneceu como um dos grandes produtores e o maior exportador de carne de frango no mundo, com 4,2 milhões de toneladas seguido dos Estados Unidos, com 3,3 milhões de toneladas de carne de frango, União Europeia, com 1,4 milhão de toneladas, Tailândia com 855 mil toneladas, e Turquia, com 456 mil toneladas. O desempenho e a produtividade exemplar da avicultura comercial brasileira, bem como, seu enorme potencial é fortemente justificado pela sanidade avícola (ABPA, 2019).

O uso de antimicrobianos na cadeia de produção de forma terapêutica, preventiva e promotora de crescimento contribuiu muito para o avanço da avicultura mundial, trazendo inúmeras vantagens para o setor com aumento significativo da produtividade, melhoria da conversão alimentar, redução no período de criação e diminuição da incidência de patologias nos animais. Entretanto, o uso excessivo ou impróprio destes produtos estimulou o aumento do número de microorganismos resistentes, dentre eles, destaca-se o *Campylobacter* spp. (FRASÃO, 2015) que é apontado pela FDA de 2012 como uma das principais causas de enterocolites em humanos, observados na Europa e nos EUA, principalmente a espécie *Campylobacter jejuni*, sendo o manuseio e consumo da carne de frango crua ou malcozida as principais fontes de transmissão deste patógeno para o homem. Por essa razão, à resistência, incluindo a multirresistência antimicrobiana é considerada de grande relevância para a saúde pública, pois podem ocorrer sérias implicações, como o insucesso no tratamento da Campilobacteriose humana. (MOORE et al., 2006). Essa questão foi ressaltada na publicação feita pela OMS em 2017, onde 12 espécies de bactérias foram consideradas a maior ameaça à saúde humana e para as quais novos antibióticos seriam necessários. Dentre essas bactérias classificadas como ‘patógenos prioritários resistentes a antibióticos’ está a resistência à fluoroquinolonas em *Campylobacter* spp. (OPAS/OMS/BRASIL, 2017).

O MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento), em 2017, estabeleceu normas que proibiam o uso de alguns tipos de antibióticos como promotores de crescimento e estabeleceram regras dessa utilização para garantir a qualidade do produto. Em 2018, foi criado o Programa Nacional de Prevenção e Controle de Resistência aos Antimicrobianos na Agropecuária – AgroPrevine, com o compromisso da implementação de um programa de vigilância, monitoramento de resistência aos antimicrobianos no âmbito da agropecuária e conscientizar as áreas de medicina humana, medicina veterinária, produção agropecuária e meio ambiente, sobre a urgência em combater a Resistência aos Antimicrobianos (MAPA, 2017; AGROSABER, 2020).

Os dados informados pela Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) e da Associação Brasileira de Proteína Animal (ABPA) apontavam que a carne de frango é a proteína animal mais consumida no Brasil e está em constante crescimento. Por se tratar de uma carne com baixo teor de gordura, ser nutritiva e rica em proteínas, é citada por especialistas como indispensável para uma alimentação saudável. Sendo assim, os produtores precisaram se preparar para iniciar um processo de redução do uso de antibióticos em suas granjas pensando também no mercado interno (ABPA, 2019; O PRESENTE RURAL, 2019).

Em 2019, a ONU e especialistas divulgaram um relatório exigindo ações imediatas, coordenadas e ambiciosas para evitar uma crise potencialmente desastrosa de resistência aos medicamentos. O Grupo de Coordenação Interagências (IACG) reuniu parceiros em toda a

ONU, organizações internacionais e indivíduos com expertise em saúde humana, animal e vegetal, bem como os setores de alimentos, ração animal, comércio, desenvolvimento e meio ambiente, para formular um projeto de combate à resistência antimicrobiana. Foi ressaltado que doenças resistentes aos antimicrobianos podem levar à pobreza extrema 24 milhões de pessoas até 2030 e devido a aumentos com os gastos de saúde, prejuízos para os sistemas alimentares e causar 10 milhões de mortes por ano até 2050 (O PRESENTE RURAL, 2019).

O advento da resistência antimicrobiana e a pesquisa com *Campylobacter* spp. assumem especial relevância no Brasil, onde há necessidade de encontrar alternativas aos medicamentos existentes para a Campilobacteriose, através do uso de agentes antimicrobianos com menor toxicidade e maior seletividade. Em uma escala mais abrangente amostras de plantas medicinais estão sendo avaliadas frente a múltiplas drogas antimicrobianas (SALIMIKIA et al., 2020). Nesse sentido, a busca por novos tratamentos envolvendo a avaliação da atividade anti-*Campylobacter* de uma série de extratos, frações e óleos essenciais de espécies vegetais, da isatina e seus derivados sintéticos são alvos do presente estudo e que apresentam como objetivos:

O objetivo geral da pesquisa foi o de avaliar o potencial de atividade antibacteriana de vários extratos, frações, óleos essenciais de espécies vegetais, derivados naturais isolados e sintéticos a linhagens de *Campylobacter* spp. sensíveis e resistentes aos antibióticos, a fim de contribuir com novas e possíveis abordagens para o combate de infecções causadas por bactérias resistentes aos antimicrobianos.

Os objetivos específicos são:

- I. Avaliar o efeito *in vitro* através do Teste de Disco- difusão de 8 espécies vegetais: Frações e derivados de *Croton cajucara* Benth (Sacaca), Extrato de *Talinum triangulare* (Beldroega), Extrato de *Cordia superba* (Baba de boi), Extrato de *Parthenium hysterophorus* (Losna-branca), Extrato de *Kalonchoe brasilienses* (Saião), Extratos de *Physalis angulata* (Physalis), Extratos de *Pyrostegia venusta* (Flor de São João) e Extratos de *Ulva fasciata* Delile (Alga) e das substâncias isoladas e sintéticas derivados de tiouréias, isatinas e mesoiônicos frente as cepas padrões de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Campylobacter jejuni* ATCC 33560.
- II. Determinar a Concentração Mínima Inibitória (MIC) e a Concentração Mínima Bactericida (MBC) da (s) amostra (s) que apresentarem atividade antibacteriana significativa no Teste de Disco-Difusão com a cepa-padrão de *Campylobacter* ATCC 33560.
- III. Avaliar o efeito *in vitro* da citotoxicidade, por cultura de células da linhagem MCR-5 (linhagem humana de pulmão), através do Teste de IC₅₀, da (s) amostra (s) que apresentarem atividade antibacteriana frente a cepas de *Campylobacter* spp.

REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Histórico

Theodor Escherich em 1886 descreveu inicialmente o gênero *Campylobacter* identificando uma bactéria com forma helicoidal, isolada de fezes diarreicas de neonatos assim como de felinos. Após diversas tentativas, sem sucesso, não foi obtido o crescimento deste microorganismo em meios sólidos. Em 1913, McFaydean e Stockman obtiveram a primeira cultura pura de bactérias em forma de vibriões, que foi chamado “vibrio” e que atualmente é conhecido como *Campylobacter fetus*, isolados do útero de uma ovelha (KIST, 1985). Em 1919, Smith e Taylor propuseram o nome *Vibrio fetus* isolados de abortos em bovinos (THEOBALD et al., 1920). Microorganismos muito semelhantes foram posteriormente descritos como *V. jejuni* e *V. coli*, isolados do jejuno de bovino e suínos, respectivamente (JONES et al., 1931; DOYLEY, 1944).

Na década dos anos 1960, estudos taxonômicos foram realizados e culminaram na criação do gênero *Campylobacter*, o qual não era formado por vibrios microaeróbicos que não possuíam semelhança ao *Vibrio cholerae*. Véron e Chatelain, em 1973 comprovaram diferenças entre esta bactéria e o gênero *Vibrio* na composição das bases do DNA. Por análises bioquímicas e sorológicas, foi proposto um novo gênero denominado *Campylobacter* o qual foi classificado em três grupos: *Campylobacter* catalase positiva e H₂S negativa (*Campylobacter fetus* subsp. *fetus* e *Campylobacter fetus* subsp. *veneralis*), *Campylobacter* catalase e H₂S positivos (*C. jejuni* e *C. coli*), e *Campylobacter* catalase negativa (*C. sputorum* subsp. *bubulus* e *C. sputorum* subsp. *sputorum*). Também nesta década foram desenvolvidos meios e técnicas apropriados que possibilitaram o isolamento a partir de fezes, permitindo uma maior compreensão desta bactéria e introduzindo-a na rotina microbiológica. (BUTZLER, 2004). Atualmente, o gênero *Campylobacter* compreende 57 espécies e 16 subespécies (EUZÉBY, 2022).

1.2 Características Descritivas do Gênero *Campylobacter*

As bactérias do gênero *Campylobacter* (de etimologia Grega *Kampulos* = curvo e *bacter* = bastão) são constituídos de bastonetes curvos em forma de vírgula, “S”, asa de gaivota ou haste espiral, suas dimensões variam entre 0,2 e 0,9 µm de largura por 0,5 a 5 µm de comprimento (Figura 1) (NACHAMKIN, 1997; BRASIL, 2011). A família Campylobacteriaceae é dividida em quatro gêneros: *Campylobacter*, *Dehalospirillum*, *Arcobacter* e *Sulfurospirillum*. São bactérias Gram-negativas, microaerófilas, não hemolíticas, não esporuladas e as colônias frequentemente não são pigmentadas. As espécies do gênero *Campylobacter* são móveis, apresentando movimento em forma de “saca-rolha ou “vai e vem”, por possuírem um flagelo polar em uma ou em ambas as extremidades. Não fermentam nem oxidam açúcares, obtendo energia a partir de aminoácidos ou de componentes intermediários do ciclo do ácido tri-carboxílico. As bactérias do gênero *Campylobacter* são oxidase-positiva e podem ou não produzir a enzima catalase. As espécies catalase positiva estão mais associadas a doenças em humanos (MEDEIROS, 2011; MEDEIROS et al., 2015).



Figura 1. Formato de células de *Campylobacter jejuni*, espiral característica e estruturas relacionadas obtidas por microscopia eletrônica de varredura. Fonte: <https://about-campylobacter.com/>

Este gênero é de difícil cultivo laboratorial, pois são bactérias sensíveis ao oxigênio, microaerófilas, requerendo uma condição ideal para sua proliferação de 5% de oxigênio, 10% de dióxido de carbono e 85% de nitrogênio. As espécies *C. jejuni*, *C. coli* e *C. lari* pertencem ao grupo das bactérias termofílicas e seu crescimento ocorre em temperatura ótima de 42°C durante um período de 48 horas, sendo as espécies *C. jejuni* (95% dos casos) e *C. coli* (5% dos casos) as mais comumente isoladas em casos de gastroenterites em humanos (MEDEIROS, 2011; MEDEIROS et al., 2015). O pH ótimo para seu crescimento é 7,0 a 7,5 e não se desenvolvem em meios com pH abaixo de 4,9 (HUMPHREY; O'BRIEN, 2007).

Em culturas antigas ou sob condições adversas de cultivo, *Campylobacter* spp. pode adquirir formas esféricas ou cocóides, o que representa um estágio degenerativo de seu ciclo de vida, sem perder seu poder infectante, representando um perigo potencial para a saúde pública e de grande importância em microbiologia de alimentos, uma vez que um alimento depois de analisado pode ser classificado como próprio para o consumo apesar de apresentar células desse patógeno que não foram previamente detectadas (NACHAMKIN, 2007; BRASIL, 2011). Essas células não são detectáveis por metodologias convencionais estando na forma viável, mas não cultivável – VNC (BOVILL; MACKEY, 1997), o que pode ser revertida após as condições se tornarem favoráveis (JANG et al., 2007).

1.3 Epidemiologia

A campilobacteriose é uma zoonose de distribuição mundial, sendo considerada a causa mais frequente de doença transmitida por alimentos (DTAs) na Europa com 9 milhões de casos por ano e custos estimados em €2,4 bilhões por ano (EFSA, 2018). Já nos EUA, o Centro de Controle de Doenças (CDC) estima que as infecções por *Campylobacter* afetam mais de 1,5 milhões de pessoas todos os anos. Ao longo do tempo tem sido observado que infecções por *Campylobacter* são mais frequentes em países desenvolvidos (CDC, 2019).

Normalmente, as espécies de *Campylobacter* estão associadas a animais de sangue quente, sendo comensais do trato gastrointestinal de bovinos, suínos, ovinos, felinos, cães, roedores silvestres e domésticos, aves domésticas e pássaros. Já foi demonstrado que um grande percentual dos animais de corte possui esse micro-organismo nas fezes. Nas aves recém-abatidas, por exemplo, constituem o principal reservatório de *C. jejuni*, sendo possível encontrá-lo em fezes e carcaças. As aves são portadoras naturais de *Campylobacter*, no entanto, não apresentam sinais clínicos da enfermidade. O suíno é o principal portador de *C. coli*, podendo ter *C. jejuni* como comensal habitual (BRASIL, 2011).

Os principais fatores de risco de campilobacteriose para os casos de enterites humanas estão associados ao consumo de água e/ou alimentos de origem animal contaminados ou

resultantes do contato com fezes de animais infectados (BRASIL, 2011). Entretanto, a maior parte dos surtos desta doença é atribuída a manipulação e ao consumo de carnes de frango e subprodutos, cruas e mal processadas sendo a responsável por 50% a 70% dos casos (HUMPHREY; O'BRIEN, 2007; MULLNER et al., 2010).

Os sintomas clínicos em pacientes infectados pelo *Campylobacter* variam desde náuseas, dores abdominais, febre, diarreia e vômito a quadros mais complexos. A diarreia se inicia geralmente após 24 horas do início dos sintomas considerada uma doença autolimitante com duração de um a sete dias, afetando os intestinos delgado e grosso. O micro-organismo é excretado nas fezes durante várias semanas após terem cessado os sintomas. Ao longo do tempo tem sido observado que infecções por *Campylobacter* são mais frequentes em países desenvolvidos (EFSA, 2021; CDC, 2021).

As infecções causadas por *Campylobacter* são geralmente esporádicas, ocorrendo nos meses de verão e no início do outono, atribuídos principalmente à manipulação inapropriada e a ingestão de carne de aves crua ou malcozida, bem como às contaminações cruzadas que podem ocorrer durante o preparo simultâneo de carne de aves e alimentos crus. A incidência de infecção segue uma distribuição bimodal, com elevado índice em bebês e crianças jovens, seguida de um segundo pico de adultos entre 20 e 40 anos (MS, 2011), não sendo necessária uma grande quantidade de células de *Campylobacter* spp. para que a doença se instale, em alguns casos, doses inferiores a 500 células são capazes de causar um quadro de infecção (CDC, 2021).

Nos países em desenvolvimento, onde o *Campylobacter* é endêmico, a infecção é geralmente limitada a crianças, com incidência decrescente, de acordo com o aumento da idade, sugerindo que a exposição no início da vida pode levar ao desenvolvimento de imunidade protetora. Tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos, as infecções assintomáticas são comuns e contribuem na transmissão do agente pela excreção assintomática (HAVELAAR et al., 2009).

No Brasil, poucos casos de infecções de origem alimentar são atribuídos a *Campylobacter* spp. (SVS, 2019), isto é, devido a legislação brasileira não exigir a pesquisa desta bactéria nos alimentos. Estas falhas no processo de notificação e pela inexistência de programas nacionais de vigilância destinados ao acompanhamento de Campilobacteriose dificultam a real compreensão da epidemiologia desta doença no país.

No perfil epidemiológico do Ministério da Saúde, publicado em maio de 2019, este informou a distribuição dos 10 principais agentes etiológicos mais identificados nos 2.030 surtos de doenças transmitidas por alimentos no período de 2009 a 2018, onde *Echerichia coli* (24%) foi a principal, seguido de *Salmonella* spp. (11,2%), *Staphylococcus aureus* (9,5%), coliformes (6,5%), norovirus (6,3%), *Shigella* (3%), *Bacillus cereus* (2,6%), *Clostridium perfringens* (1,7%) e o vírus da hepatite A (1,2%). Sobre o patógeno *Campylobacter*, os dados encontrados na literatura ainda são escassos e informações quantitativas quase inexistentes.

Sendo o Brasil o maior exportador de carne de frango do mundo e a União Europeia o seu principal comprador, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) inseriu então no seu escopo de referência o ensaio de quantificação de *Campylobacter* spp. (DOC/CGAL n° 004) em carnes e produtos cárneos, baseando-se no critério de higiene do processo descrito no Regulamento (CE) n° 2017/2005, em vigor desde 1° de janeiro de 2018. O critério é relevante para as indústrias e aplica-se a um limite de < 1.000 UFC/g (Unidade formadora de colônia por grama). Esse novo regulamento visa manter sob controle as carcaças e reduzir o número de casos de campilobacterioses atribuídas ao consumo de carne de frango. A notificação de dados da conformidade como o novo critério são obrigatórias desde 2020 (FRODER et al., 2021).

No Brasil, a gastroenterite em humanos acomete principalmente crianças (BRASIL, 2011). Apesar de todos os estudos disponíveis sobre *Campylobacter* spp., a epidemiologia

ainda não se encontra totalmente esclarecida, havendo algumas lacunas do seu conhecimento. Em alguns países ainda não foi determinada a verdadeira incidência das infecções por este agente, sendo necessário esclarecer a importância das diferentes fontes de infecção e o papel do hospedeiro no efeito da doença (RANDALL et al., 2003).

Na Argentina, os estudos referentes a *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* são incipientes. No entanto, o sorotipo O:19 de *C. jejuni* foi associado à síndrome de Guillain Barré em uma avaliação realizada em diferentes estágios de três cadeias de abastecimento de carne de aves em Santa Fé, na Argentina. Neste estudo, foi detectado que 18% dos isolados de *C. jejuni* pertenciam ao sorotipo O:19. Também foi determinado que a presença dessas cepas se dá em quase todas as etapas de produção. Os resultados dessa análise refletem e reforçam um risco significativo para a saúde pública e que os estudos epidemiológicos de *Campylobacter* devem ser considerados para estabelecer uma política de gerenciamento de risco (ROSSLER et al., 2017).

1.4 Resistência Bacteriana

A partir de 1928, quando Alexandre Fleming descobriu a penicilina, começou a chamada era dos antibióticos e nas décadas seguintes, houve um aumento exponencial na criação de novas classes desses agentes, principalmente nos países desenvolvidos. Os antibióticos, foram considerados uma das melhores descobertas do século XX e uma revolução para a medicina. Muitas vidas foram salvas e sua descoberta foi decisiva na história humana. No entanto, o aumento da resistência aos antibióticos em hospitais, comunidades e meio ambiente tem sido observado conforme seu uso. Atualmente, o tratamento de infecções está cada vez mais comprometido pela capacidade das bactérias de desenvolverem resistência aos antibióticos por meio de mutações ou aquisição de genes de resistência (LIU; POP, 2009; DAVIES; DAVIES, 2010).

O surgimento de micro-organismos resistentes como sabemos é um fenômeno natural, o qual é acelerado pela pressão seletiva exercida pelo uso indiscriminado de agentes antimicrobianos no tratamento de infecções em seres humanos e na Medicina Veterinária, para tratamento e para prevenção de doenças (promotores de crescimento) nos animais. Essas classes de antimicrobianos normalmente são as mesmas utilizadas na cadeia de produção animal e humanos favorecendo assim, o surgimento e disseminação de bactérias zoonóticas resistentes, como *Salmonella* spp. e *Campylobacter* spp. (WHO, 2014; EFSA, 2017; BYAMBAJAV et al., 2020).

Quando expostos a antimicrobianos, *Campylobacter* spp. e outras bactérias comensais do trato gastrointestinal podem diminuir a sua sensibilidade a estes fármacos e se tornar potenciais reservatórios de genes de resistência, que podem ser transferidos a outras bactérias por plasmídeos, integrons e transposons. Além disso, os antimicrobianos podem permanecer como resíduos em produtos de origem animal que após o consumo destes alimentos podem ser despejados no ambiente por efluentes humanos ou de animais (FÀBREGA et al., 2008).

Na maioria dos casos a campilobacteriose é autolimitada, mas pacientes com sintomatologia prolongada são geralmente colocados em regime de tratamento com antibióticos como macrolídeos ou fluoroquinolonas. E a resistência a essas classes de antibióticos em *Campylobacter*, especialmente à fluoroquinolonas, está aumentando consideravelmente (FDA, 2015, BOLINGER et al., 2018). Esse aumento da resistência também tem sido visto nos Estados Unidos, onde dois importantes antibióticos anti-*Campylobacter* como a azitromicina (macrolídeo) e a ciprofloxacina (fluoroquinolona) resultou em aproximadamente 310.000 casos de infecções potencialmente intratáveis, em 2019, com 28 mortes/ano (CDC, 2019; YANG et al., 2019).

No Brasil, vários estudos também têm sido relatados mostrando alta prevalência de *Campylobacter* spp. isolados de carcaças e frangos resistentes às fluoroquinolonas e tetraciclina. Hungaro e colaboradores, em 2015, encontraram 95% e 40% (n=20) de resistência à ciprofloxacina e à tetraciclina, respectivamente em isolados de *C. jejuni* em Minas Gerais. Moura e colaboradores, em 2013 igualmente relataram alta prevalência de isolados de *C. jejuni* resistentes à ciprofloxacina 100% (16/16) e resistentes à tetraciclina 93,75% (15/16). Nesse estudo também observaram a resistência à eritromicina 68,75% (11/16). Frasso e colaboradores (2015) encontraram 100% de resistência à ciprofloxacina e 42,5% de resistência à enrofloxacin em *Campylobacter* spp. em 80 frangos de criação orgânica. A Figura 2 mostra as estruturas químicas dos antibióticos citados.

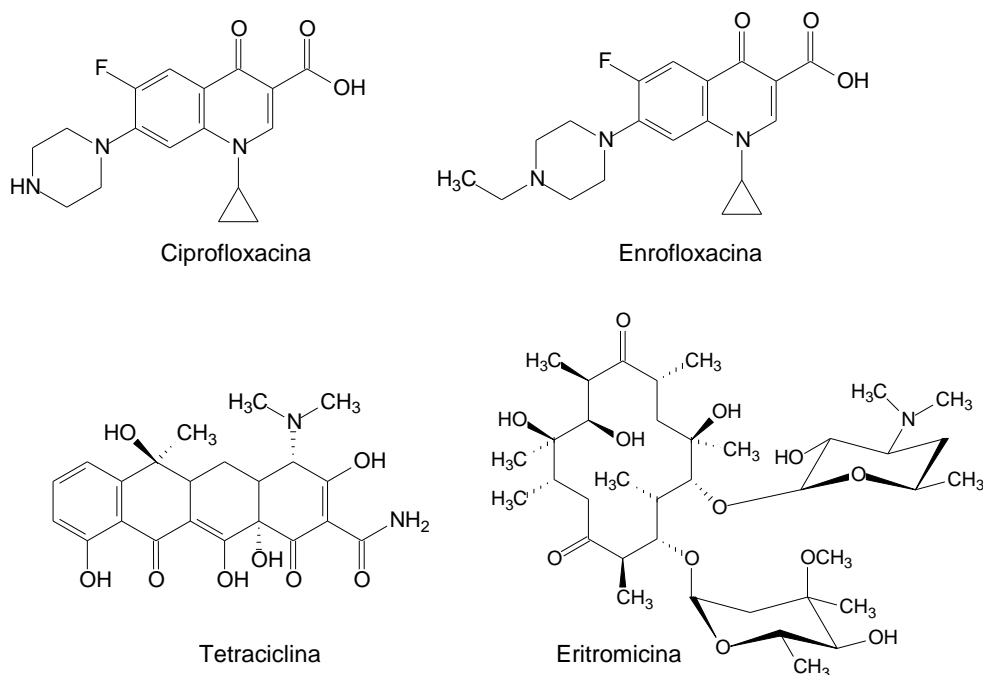


Figura 2. Estruturas químicas dos antibióticos utilizados em clínica para o tratamento de *Campylobacter* spp, os quais já encontramos isolados resistentes.

Este fenômeno da resistência aos antimicrobianos (AMR) portanto tem representado uma ameaça sanitária global crescente, que deve ser abordada com urgência na saúde pública, na produção animal, agrícola e no meio ambiente porque põe em risco o tratamento eficaz de várias infecções resultando em enfermidades mais prolongadas e com maior mortalidade (WHO, 2020).

Essa disseminação global de bactérias multirresistentes e pan-resistentes aos antimicrobianos (também conhecidas como ‘superbactérias’) fez a Organização Mundial de Saúde (OMS) publicar, em 2017, sua primeira lista de ‘patógenos prioritários resistentes a antibióticos’ (Tabela 1), onde 12 famílias de bactérias são consideradas a maior ameaça à saúde humana e que necessitam do desenvolvimento de novos antibióticos para enfrentar a crescente resistência global aos medicamentos antimicrobianos. Nesta lista, o *Campylobacter* spp., resistente à fluoroquinolonas está descrito como prioridade alta, junto com outras bactérias que são cada vez mais resistentes aos fármacos (WHO, 2017).

Tabela 1. Lista de patógenos prioritários resistentes a antibióticos. Fonte: OMS, 2017.

Prioridade 1: CRÍTICA	Resistência ao Antibiótico
<i>Acinetobacter baumannii</i>	Carbapenema
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Carbapenema
<i>Enterobacteriaceae</i>	Carbapenema
Prioridade 2: ALTA	
<i>Enterococcus faecium</i>	Vancomicina
<i>Staphylococcus aureus</i>	Meticilina e intermediário à vancomicina
<i>Helicobacter pylori</i>	Claritromicina
<i>Campylobacter</i> spp.	Fluoroquinolona
<i>Salmonella</i>	Fluoroquinolona
<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Cefalosporina, Fluoroquinolona
Prioridade 3: MÉDIA	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	Não suscetível à penicilina
<i>Haemophilus influenzae</i>	Ampicilina
<i>Shigella</i> spp.	Fluoroquinolona

O consumo descontrolado e inadequado de antibióticos contribui para a disseminação de doenças e aumento da resistência (ANVISA, 2019). Por exemplo, na Índia, os isolados de *Campylobacter* são frequentemente resistentes a múltiplos medicamentos e têm resistência fenotípica a ciprofloxacina, tetraciclina, furazolidona, ampicilina, gentamicina e eritromicina (JAIN et al., 2005). Na América Central, observou-se que essa tendência também é verdadeira, com *Campylobacter* resistente a antibióticos em ascensão (TOLEDO et al., 2018). A Figura 3 mostra as estruturas químicas dos antibióticos citados.

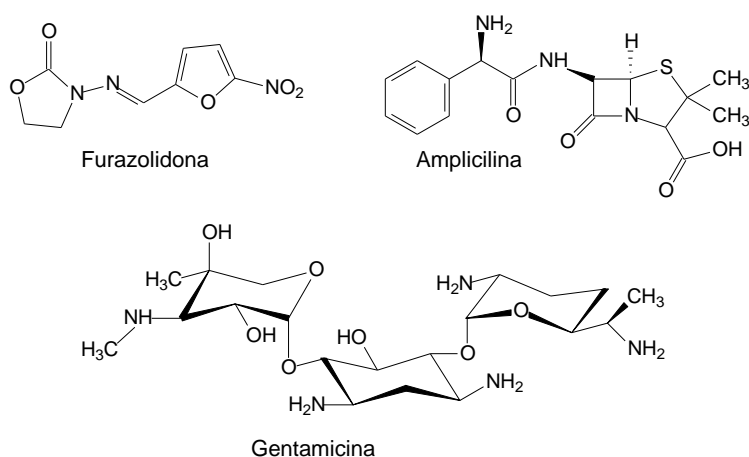


Figura 3. Estruturas químicas dos antibióticos, os quais isolados de *Campylobacter* já apresentam mecanismos de resistência.

Uma ação simples, mas essencial, no combate a resistência antimicrobiana é a redução nas falhas de tratamento de doenças diarreicas em países de baixa renda, que pode prevenir o aumento de *Campylobacter* resistente a antibióticos, em certas populações, os quais estão em maior risco de complicações graves. Essas populações, como imunocomprometidos ou idosos, provavelmente são submetidas normalmente a regimes de antibióticos para prevenir a bacteremia e sequelas. Especificamente, os pacientes com HIV os quais são particularmente vulneráveis, pois as infecções podem ser intratáveis com a bacteremia, necessitando, em última instância, de terapia com macrolídeo ou fluoroquinolona (HUSSEIN et al., 2016).

A crescente preocupação com este tema tem levado ao desenvolvimento de diversas medidas, principalmente na área de produção mundial de carnes que vem passando por algumas mudanças. Na União Europeia o uso de antibióticos como promotores de crescimento foi proibido em 01 de janeiro de 2006, permitindo o uso de antibióticos somente via prescrição veterinária (COUNCIL OF EUROPEAN UNION, 2003). Nos EUA foi estabelecido uma lei na Califórnia, controlando o uso de antibióticos para a alimentação animal (SCOTT et al., 2019). Na China, Índia e em outros países também foram estabelecidos programas de vigilância e contenção da resistência. O mesmo aconteceu nos níveis panamericanos e nacional: na Argentina, onde estratégias foram implementadas pelo Ministério da Saúde e outras organizações, entre elas podemos citar a atual proibição do uso de antimicrobianos na formulação de rações animais e como promotores de crescimento, que entraria em vigor no corrente ano (SENASA, 2015).

No Brasil também vem sendo estabelecidas políticas de maior controle da utilização de promotores de crescimento e antibióticos na alimentação animal, com regulamentação e fiscalização por parte do MAPA. A lista de aditivos promotores de crescimento permitidos na alimentação animal vem sendo revisada, e alguns deles passaram a ser proibidos. A Portaria N° 171, de 13 de dezembro de 2018, informou sobre a intensão de proibição do uso de antimicrobianos com a finalidade de aditivos melhoradores de desempenho, colocando em discussão cinco aditivos antimicrobianos (MAPA, 2018). Recentemente, o MAPA proibiu em Instrução Normativa N° de 13 de janeiro de 2020, em todo o território nacional a importação, a fabricação, a comercialização e o uso de melhoradores de desempenho que contenham os antimicrobianos tilosina, lincomicina e tiamulina, moléculas classificadas como importantes na medicina humana (MAPA, 2020).

Com o intuito de realizar a redução da demanda de antimicrobianos em todos os setores e aumentar o número de antimicrobianos eficazes, torna-se necessário a implementação de campanhas de conscientização pública, a redução no uso desnecessário de antimicrobianos na agricultura, tanto em humanos quanto em animais, a promoção no desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico rápido para evitar o uso desnecessário de antimicrobianos e o incentivo no uso de vacinas. Além dessas medidas, as pesquisas nos setores públicos e privado devem ser promovidas, e, no caso da indústria farmacêutica, é necessário implementar políticas de “incentivos” que se ajustam às necessidades de saúde pública (OPAS, 2018).

Existe um firme compromisso da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura (FAO), a Organização Mundial de Saúde Animal (OIE) e a Organização Pan Americana da Saúde (OPAS), para combater a AMR, trabalhando de forma coordenada para mitigar os riscos na interface saúde pública, animal e ao meio ambiente. Sob este contexto, as três organizações uniram forças para a implementação do projeto ‘Trabalhando juntos para combater a resistência aos antimicrobianos’ sob o enfoque de Saúde Única que reconhece a multidimensionalidade e a necessidade de uma resposta intersetorial que este problema exige. O objetivo estratégico geral deste projeto apoiado e financiado pela União Europeia, com duração de três anos (2020-2022), é apoiar os esforços para combater a resistência aos antimicrobianos por meio da implementação dos Planos de Ação Nacional de sete países: Argentina, Brasil, Chile, Colômbia, Paraguai, Peru e Uruguai (OPAS, 2020).

Em razão do aumento dessa resistência bacteriana às múltiplas drogas antimicrobianas, diversos estudos com extratos e óleos essenciais de plantas medicinais têm sido realizados à procura de novas alternativas terapêuticas para as doenças infecciosas.

1.5 Plantas Medicinais

As plantas medicinais são utilizadas para tratar doenças que acometem a saúde desde os primórdios da civilização por vários povos, fazendo parte da história e são empregadas de diversas maneiras na alimentação, em práticas religiosas, no folclore e na medicina.

No mundo, cerca de 80% da população utiliza recursos da medicina popular para o tratamento de alguma doença, sendo a fitoterapia um método terapêutico milenar, cujas bases científicas são evidenciadas em muitos países, além de ser muito eficaz na medicina alternativa. Neste sentido, é possível ressignificar o uso devido da biodiversidade e valorar as culturas tradicionais locais (MENDONÇA et al., 2018).

No Brasil, devido à grande biodiversidade de plantas, este possui uma das mais ricas floras do mundo, com um número estimado de cerca de 20% do número total de espécies do planeta. O país contempla um valor superior a duzentas mil espécies de plantas, animais e micro-organismos descritos (CALIXTO, 2005). Cerca de aproximadamente 48% dos medicamentos empregados na terapêutica advêm, direta ou indiretamente, de produtos naturais, especialmente de plantas medicinais que permanecem como uma importante fonte para obtenção de medicamentos (CARVALHO et al., 2007). Sob este aspecto, verifica-se que a fitoterapia vem crescendo cada vez mais no país, tornando-se um setor econômico importante, devido a sua popularidade como alternativa nos cuidados com a saúde (LIMA et al., 2006).

O uso de plantas medicinais, embora seja um recurso autêntico do saber popular, necessita também do conhecimento científico das suas propriedades químicas, farmacológicas e terapêuticas para a obtenção de fármacos naturais seguros e para o desenvolvimento de moléculas sintéticas para a produção de novos medicamentos.

A política para o uso de plantas medicinais no serviço público no Brasil foi estabelecida através da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e a Política de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), criadas pelo Ministério da Saúde e ambas publicadas em 2006 (BRASIL, 2006). Essas duas políticas promoveram modificações na regulamentação de plantas medicinais e fitoterápicos reconhecendo os seus potenciais terapêuticos visando o seu melhor aproveitamento para a população brasileira. E desde então, a fitoterapia foi inserida nos cursos de graduação da área da saúde, promovendo a disseminação do uso desse tipo de tratamento, a fim de aprofundar o conhecimento, atestar a eficácia e a segurança quando da sua utilização. Visando com isso, aumentar o respaldo científico, reduzindo o descrédito e o preconceito que ainda é marcante entre profissionais de saúde, gestores e usuários.

O Ministério da Saúde também financiou a capacitação de 440 farmacêuticos em Gestão da Fitoterapia e Homeopatia, no SUS, em treze instituições de ensino superior/escolas de Saúde Pública (IES/ESP) do país. Outra medida foi a realização de um curso à distância sobre Fitoterapia para médicos do SUS, que teve início em janeiro de 2012 e contou com a participação de 300 médicos de todo o Brasil, mas apesar disso o uso da fitoterapia ainda encontra dificuldades para ser implementada nos serviços de saúde, por vários fatores que impedem que seu potencial seja explorado, o que seria um benéfico para os usuários, para o SUS e para o Brasil (BRASIL, 2006; BRASIL, 2012).

Várias normas foram publicadas, ou atualizadas depois disso, para adequarem as mesmas, abrangendo um arcabouço legislativo para regulamentação das classes: plantas medicinais, drogas vegetais notificadas, medicamentos fitoterápicos manipulados e industrializados (CARVALHO et al., 2012).

Nos últimos anos, várias pesquisas têm sido realizadas com contribuições relevantes sobre o assunto, não só quanto aos aspectos fitoquímicos, mas também quanto à atividade biológica de uma grande variedade de plantas medicinais, dentre esses relatos podemos destacar alguns estudos com atividade antibacteriana.

Gadisia e Usman, em 2021, realizaram a avaliação antibacteriana combinada de óleos essenciais extraídos das partes aéreas do *R. abyssinicus*, *C. pustulatus* e *D. penninervium* frente a isolados multi-resistentes de úlceras cutâneas. Um forte efeito sinérgico foi observado entre *R. abyssinicus* e *D. penninervium* e um efeito antibacteriano promissor mais especificamente frente as bactérias MRSA e *P. aeruginosa* (GADISA & USMAN, 2021).

Tushar e colaboradores em 2021, em um outro estudo avaliaram a atividade antimicrobiana de extratos metanólicos de *Vernonia cinerea* frente a *Xanthomonas oryzae* (Xoo), um agente que causa a praga bacteriana no arroz. Os defensivos agrícolas disponíveis atualmente são tóxicos para o ambiente, bem como para os seres humanos. Por esse motivo, tornou-se necessário desenvolver novas alternativas contra Xoo. Esse estudo sugere substâncias específicas de *V. cinérea* que poderão ser utilizadas para desenvolver potenciais candidatos a pesticidas naturais e, assim, fornecer melhores resultados para o combate ao Xoo que infesta o arroz (JOSHI et al., 2021).

Uma aplicação importante ainda em detrimento da demanda por redução de defensivos agrícolas tóxicos foi a revisão proposta recentemente, de comparar a eficácia entre antimicrobianos naturais (NA) e nanoencapsulados (nNA) e sua forma livre *in vitro* e *in situ*, pois embora estudos *in vitro* sejam frequentemente utilizados estes apresentam características diferentes das encontradas nos alimentos. Os óleos essenciais e nanoemulsões apresentam maior eficácia antimicrobiana e não causam prejuízos sensoriais nos alimentos em comparação ao NA livre. A nonocapsulação promove de forma lenta e prolongada a ação antimicrobiana e previne a ação antibacteriana ao longo do tempo (LELIS et al., 2021).

Levando em consideração a pesquisa com *Campylobacter*, Salimikia e colaboradores, em 2020 fizeram uma mini revisão de literatura, onde encontraram nas bases de dados 57 artigos, dos quais 27 artigos (período de 1994 a 2013) foram selecionados de acordo com os critérios dos autores. Nesta revisão os autores relataram que 71 plantas medicinais apresentaram efeitos anti-*Campylobacter* spp. e que estão descritos na Tabela 2.

Tabela 2. Lista de plantas medicinais frente as espécies de *Campylobacter*

	Nome Científico	Família	País de origem da planta	Bactéria estudada
1	<i>Cryptolepis sanguinolenta</i>	Asclepiadaceae	Oeste da Africa	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
2	<i>Zingiber ottensii</i> Veleton	Zingiberaceae	Tailandia	<i>C. jejuni</i>
3	<i>Ocimum basilicum</i> L. var. <i>citratum</i>	Lamiaceae	Tailandia	<i>C. jejuni</i>
4	<i>Mentha arvensis</i> L. var. <i>piperascens</i> Malinv.	Lamiaceae	Tailandia	<i>C. jejuni</i>
5	<i>Cymbopogon citratus</i> Stapf.	Poaceae	Tailandia	<i>C. jejuni</i>
6	<i>Allium odorum</i> L.	Liliaceae	Taiwan	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
7	<i>Hibiscus sabdariffa</i> L.	Malvaceae	Taiwan	<i>C. jejuni</i> , <i>C. coli</i> e <i>C. fetus</i>
8	<i>Leptospermum petersonii</i>	Myrtaceae	Australia	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
9	<i>Melaleuca alternifolia</i>	Myrtaceae	Australia	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
10	<i>Backhousia citriodora</i>	Myrtaceae	Australia	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i>
11	<i>Origanum minutiflorum</i>	Lamiaceae	Turquia	<i>C. jejuni</i> , <i>C. lari</i> e <i>C. coli</i>
12	<i>Epinetrum villosum</i>	Menispermaceae	República do Congo e Angola	<i>C. jejuni</i> ATCC 24428, <i>C. coli</i> ATCC 33559
13	<i>Mammea africana</i>	Clusiaceae	Africa Tropical	<i>C. jejuni</i> ATCC33291
14	<i>Searsia chirindensis</i> L.	Anacardiaceae	Africa do Sul	<i>C. jejuni</i> ATCC29428
15	<i>Terminalia macroptera</i>	Combretaceae	Oeste da Africa	106 isolados de <i>Campylobacter</i> sp. (casos de gastroenterites em Portugal)
16	<i>Grape Vitis vinifera</i>	Vitaceae	Espanha	12 isolados de <i>Campylobacter</i> (4 clínicos, 4 frangos, 2 NCTC, 2 ATCC)

17	<i>Lippia javanica</i>	<i>Verbenaceae</i>	Africa do Sul	110 isolados clínicos de <i>Campylobacter</i>
18	<i>Pterocarpus angolensis</i>	<i>Fabaceae</i>	Africa do Sul	110 isolados clínicos de <i>Campylobacter</i>
19	<i>Senna hirsuta</i>	<i>Fabaceae</i>	Nigéria	Isolados clínicos de <i>C. jejuni</i>
20	<i>Daniella oliveri</i>	<i>Caesalpiniaceae</i>	Nigéria	Isolados clínicos de <i>C. jejuni</i>
21	<i>Landolphia dulcis</i>	<i>Apocynaceae</i>	Nigéria	Isolados clínicos de <i>C. jejuni</i>
22	<i>Zingiber officinale</i>	<i>Zingiberaceae</i>	Austrália	<i>C. jejuni</i> (NCTC: 11828)
23	<i>Capsicum annum</i>	<i>Solanaceae</i>	Austrália	<i>C. jejuni</i> (NCTC: 11828)
24	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	<i>Fabaceae</i>	Austrália	<i>C. jejuni</i> (NCTC: 11828)
25	<i>Taraxacum officinale</i>	<i>Asteraceae</i>	Austrália	<i>C. jejuni</i> (NCTC: 11828)
26	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Lamiaceae</i>	Austrália	<i>C. jejuni</i> (NCTC: 11828)
27	<i>Tabebuia impetiginosa</i>	<i>Bignoniaceae</i>	Austrália	<i>C. jejuni</i> (NCTC: 11828)
28	<i>Acacia farnesiana</i>	<i>Fabaceae</i>	México	Isolados clínicos de <i>C. jejuni</i> ,
29	<i>Artemisia ludoviciana</i>	<i>Asteraceae</i>	México	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> ,
30	<i>Opuntia ficusindica</i>	<i>Cactaceae</i>	México	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> ,
31	<i>Cynara scolymus</i>	<i>Asteraceae</i>	México	<i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> ,
32	<i>Citrus bergamia</i>	<i>Rutaceae</i>	Reino Unido	<i>C. jejuni</i> ATCC 33291
33	<i>Marigold taegetes</i>	<i>Asteraceae</i>	USA	<i>C. jejuni</i>
34	<i>Ginger</i>	<i>Zingiberaceae</i>	USA	<i>C. jejuni</i>
35	<i>Jasmine</i>	<i>Oleaceae</i>	USA	<i>C. jejuni</i>
36	<i>Patchouli</i>	<i>Lamiaceae</i>	USA	<i>C. jejuni</i>
37	<i>Gardenia</i>	<i>Rubiaceae</i>	USA	<i>C. jejuni</i>
38	<i>Cedar</i>	<i>Pinaceae</i>	USA	<i>C. jejuni</i>
39	<i>Carrot</i>	<i>Apiaceae</i>	USA	<i>C. jejuni</i>
40	<i>Celery</i>	<i>Apiaceae</i>	USA	<i>C. jejuni</i>
41	<i>Mugwort</i>	<i>Asteraceae</i>	USA	<i>C. jejuni</i>
42	<i>Spikenard</i>	<i>Araliaceae</i>	USA	<i>C. jejuni</i>
43	<i>Orange bitte</i>	<i>Rutaceae</i>	USA	<i>C. jejuni</i>
44	<i>Adenantha pavonina</i>	<i>Fabaceae</i>	Tailândia	<i>C. jejuni</i> ATCC 29428
45	<i>Annona squamosa</i>	<i>Annonaceae</i>	Tailândia	<i>C. jejuni</i> ATCC 29428
46	<i>Eleutherine americana</i>	<i>Iridaceae</i>	Tailândia	65 <i>Campylobacter</i> (39 humanos e 26 frangos)
47	<i>Drypetes gosseweileri</i>	<i>Euphorbiaceae</i>	Camarão	Clínicos de <i>C. jejuni/ coli</i>
48	<i>Pleiocarpa sp</i>	<i>Apocynaceae</i>	Camarão	Clínicos de <i>C. jejuni/ coli</i>
49	<i>Zingiber officinale</i>	<i>Zingiberaceae</i>	Malásia	<i>C. jejuni</i>
50	<i>Curcuma longa</i>	<i>Zingiberaceae</i>	Malásia	<i>C. jejuni</i>
51	<i>Alpinia galanga</i>	<i>Zingiberaceae</i>	Malásia	<i>C. jejuni</i>
52	<i>Enantia chlorantha</i>	<i>Annonaceae</i>	Camarão	Clínicos de <i>C. jejuni/ coli</i>
53	<i>Eucalyptus occidentalis</i>	<i>Myrtaceae</i>	Austrália	Isolados de aves de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> (ATCC43484)
54	<i>Eucalyptus gomphocephala</i>	<i>Myrtaceae</i>	Austrália	Isolados de aves de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> (ATCC43484)
55	<i>Acacia baileyana</i>	<i>Fabaceae</i>	Austrália	Isolados de aves de <i>C. jejuni</i> e <i>C. coli</i> (ATCC43484)
56	<i>Calendula officinalis</i>	<i>Asteraceae</i>	Austrália	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (ATCC 700819)

57	<i>Matricaria recutita</i>	<i>Asteraceae</i>	Australia	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (ATCC 700819)
58	<i>Foeniculum vulgare</i>	<i>Apiaceae</i>	Australia	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (ATCC 700819)
59	<i>Zingiber officinale</i>	<i>Zingiberaceae</i>	Australia	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (ATCC 700819)
60	<i>Salvia officinalis</i>	<i>Lamiaceae</i>	Australia	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (ATCC 700819)
61	<i>Silybum marianum</i>	<i>Asteraceae</i>	Australia	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (ATCC 700819)
62	<i>Hydrastis Canadensis</i>	<i>Ranunculaceae</i>	Australia	<i>C. jejuni</i>
63	<i>Filipendula ulmaria</i>	<i>Rosaceae</i>	Australia	<i>C. jejuni</i>
64	<i>Glycyrrhiza glabra</i>	<i>Fabaceae</i>	Australia	<i>C. jejuni</i>
65	<i>Curcuma longa</i>	<i>Zingiberaceae</i>	Australia	Isolados Clínicos de <i>C. jejuni</i>
66	<i>Origanum vulgare</i>	<i>Lamiaceae</i>	Australia	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (ATCC 700819)
67	<i>Syzygium aromaticum</i>	<i>Myrtaceae</i>	Australia	<i>C. jejuni</i> NCTC 11168 (ATCC 700819)
68	<i>Allium sativum</i>	<i>Amaryllidaceae</i>	USA	4 isolados de <i>C. jejuni</i> (ATCC33291, ATCC33560, ATCC43430, e ATCC 49943)
69	<i>Dracocephalum multicaule</i>	<i>Lamiaceae</i>	Irã	<i>C. coli</i> e <i>C. jejuni</i>
70	<i>Heracleum lasiopetalum</i>	<i>Apiaceae</i>	Irã	<i>C. coli</i> e <i>C. jejuni</i>
71	<i>Acacia nilotica</i>	<i>Fabaceae</i>	Nigéria	<i>C. coli</i> (isolado de cabra)

Nesta revisão, podemos observar que, embora vários estudos sobre a atividade biológica das plantas medicinais frente as espécies de *Campylobacter* tenham sido descritas, os dados são inexistentes em relação a isatina e aos outros compostos estudados nesta tese.

As indústrias se concentram em programas de triagem a fim de identificar novos antibióticos a partir de fontes naturais (KUMAR et al., 2010). Além disso, o aumento alarmante na incidência de novas doenças infecciosas e resistência aos fármacos atuais, vem mostrando a necessidade em descobrir novos compostos químicos com atividade antimicrobiana e, possivelmente, com novos mecanismos de ação (ADWAN et al., 2010). Nesta perspectiva, o interesse da comunidade científica por pesquisas na área de produtos naturais com potencial para atividade biológica, vem claramente crescendo.

1.6 Isatina e seus Derivados com Atividade Biológica

A isatina foi sintetizada pela primeira vez por Erdman e Laurent em 1840, como um produto da oxidação do corante índigo por ácido nítrico e cromo (CANDIDO-BACANI et al., 2011). Este composto que possui em sua estrutura um núcleo indólico, um anel aromático sujeito a reações de substituição eletrofílica aromática principalmente nas posições 5 e 7, duas carbonilas (uma cetônica e uma amídica) com reatividade distintas (passíveis de reações de adição, condensação e redução, por exemplo) e um grupamento N-H que pode sofrer reações de N-alkilação ou N-acilação (MATHUR; NAIN, 2004). Portanto, vem sendo amplamente utilizado em síntese orgânica (SILVA et al., 2010) e possibilita a formação de novos compostos heterocíclicos com diferentes atividades (KHAN et al., 2015) (Figura 4).

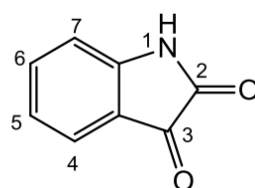


Figura 4. Estrutura da isatina (1H-indol-2,3-diona). Fonte: SILVA, 2018.

Acreditou-se que, por aproximadamente mais de 100 anos a isatina era um composto exclusivamente sintético. Contudo, foi extraída a partir de plantas da espécie *Isatis tinctoria*, e da espécie *Couroupita guianensis* Aubl (Figura 5A e B), *Melochia tomentosa*, *Boronela koniamboensis* e, também, presente de forma endógena nos animais como nas secreções da glândula parótida do sapo Bufo, nas massas de ovos do molusco australiano *Dicathais orbita*. (SILVA, 2010, SILVA, 2018).



Figura 5. *Couroupita guianensis* Aubl. A. Árvore; B. Cachos e flores. Fonte: a autora (2021).

A Figura 6 mostra que a partir do núcleo indol comprovou-se diversas atividades farmacológicas. O heterociclo isatina, por exemplo, que deriva deste precursor, é uma molécula pequena e versátil, e tornou-se uma matéria-prima importante para a síntese de um amplo espectro de compostos bioativos com um amplo perfil farmacológico e de diversas propriedades biológicas como antibacteriana, anti-HIV, anti-inflamatórias, anti-helmínticos, antioxidante, anticonvulsivos e, anticancerígenas e anti-tuberculares, entre outros (SILVA, 2010; SHARMA, 2010).

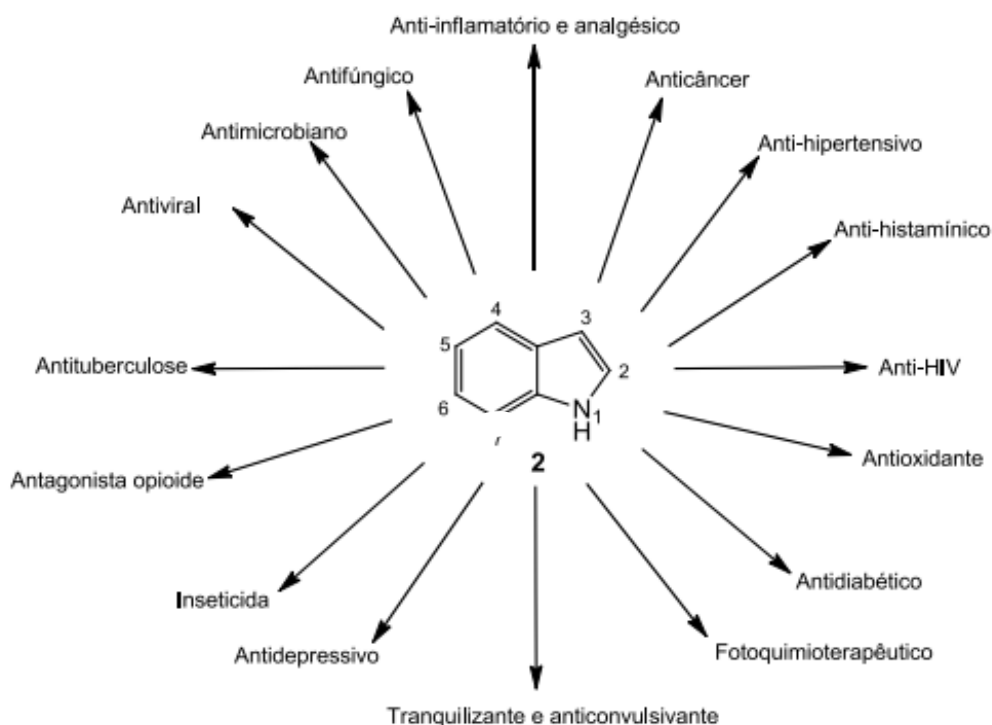


Figura 6. Núcleo indol e suas principais atividades biológicas. Fonte: SHARMA et al., 2010

Um exemplo do uso da isatina como matéria-prima de fármacos é o caso do sunitinibe (Figura 7), aprovado, em 2006, pelo FDA para o tratamento de carcinoma de células renais (RCC) e de tumores do estroma gastrointestinal (GIST) (FAIVRE et al., 2007). Em 2011, também foi aprovado para o tratamento de câncer pancreático raro (VINIK; RAYMOND, 2013).

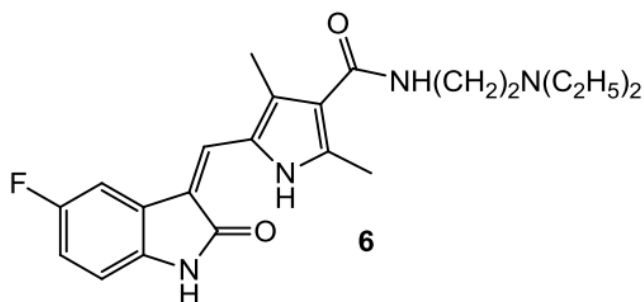


Figura 7. Estrutura do sunitinibe. Fonte: FAIVRE et al., 2007.

Musa Özil e colaboradores, em 2011 analisaram os híbridos de isatina-1,2,4-triazoles e verificaram atividades antibacterianas fracas a moderada com valores de MIC de 8-500 µg/mL frente a bactérias Gram-positivas *S. aureus* e *B. subtilis* e Gram-negativas como a *E. coli* e *P. aeruginosa* e não foram superiores à ampicilina de referência (MIC = 0,8-1,6 µg/mL).

Em 2016, Therani e colaboradores também realizaram um estudo referente a atividade antimicrobiana dos seus derivados de hidrazona sintetizados. As cepas bacterianas utilizadas foram *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *S. aureus*

resistente à *meticilina* (MRSA, ATCC 43300). A amicacina foi utilizada como um antibiótico padrão. O mais interessante, nesse estudo, é que os seus derivados testados exibiram uma excelente atividade frente a *P. aeruginosa*, apresentando MIC = 6,25 µg/mL. Este resultado foi muito importante uma vez que *P. aeruginosa* é um patógeno altamente oportunista e clinicamente importante.

A versatilidade estrutural com que podem ser sintetizadas, seja através da incorporação de dois ou mais farmacóforos em um único composto híbrido representa uma estratégia promissora da isatina no desenvolvimento de novos medicamentos com potencial para superar a resistência cruzada e aumentar a potência em comparação com os medicamentos originais (REN et al., 2018; XU et al., 2018).

A isatina e seus derivados são uma escolha razoável, pois avanços recentes desses derivados, incluindo isatina-azol, isatina-quinolina / quinolona, isatina-furano / cumarina, isatina-hidrazona / (tio) semicarbazona, dímeros de isatina e híbridos de isatina-indol tem se mostrado como um agente promissor para potenciais agentes antibacterianos com espectro mais amplo, maior potência, menor toxicidade e múltiplos mecanismos de ação (GUO, 2018).

Diversos grupos de pesquisa têm descrito estudos na literatura em relação ao potencial da isatina e seus derivados na atividade antimicrobiana de diversas bactérias, seja dos gêneros das bactérias Gram-positivas ou das Gram-negativas. Nesse contexto, com este estudo de tese vimos possíveis resultados promissores da isatina em relação as principais espécies de *Campylobacter*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Equipamentos e Materiais

- Estufa bacteriológica à 37 °C e 42 °C – marca: Fanem.
- Microscópio binocular - marca: Nikon
- Cabine de segurança biológica - marca: Vecco
- Balança analítica - marca: Sartorius
- Banho-maria - marca: Fanem
- Micro-ondas - marca: Electrolux
- Freezer - marca: Fanem
- Geladeira – marca: Fanem:
- Leitor de placa de ELISA – marca: Loccus
- Recipiente/Jarra com atmosfera de microaerofilia – marca: BD GasPaK™ EZ
- Alça de platina
- Bico de Bunsen
- Discos de difusão de 6 mm, estéreis
- Tubos de vidro estéreis, com capacidade de 5 mL
- Régua para medição dos halos
- Microplacas estéreis contendo 96 orifícios – marca: ARCA COSTAR
- Placas de petri descartáveis – marca: CORNING
- Proveta – marca: Pyrex
- Pipetador automático – marca: Eppendorf
- Pipetas descartáveis estéreis – marca: KASVI
- Ponteiras, descartáveis, estéreis, com capacidade de 1,0-200 µL e 1000 µL
- SWAB – cotonete estéril
- Tubo 0,5 Escala de McFarland
- Microtubos estéreis com capacidade de 1,5 mL – marca: Falcon
- Micropipetas com capacidades de 5 µL, 10 µL, 100 µL e 100 µL – marca: Eppendorf
- Jarra de anaerobiose – marca: BD GasPaK™ EZ
- Envelope para atmosfera de microaerofilia

2.2 .Reagentes

- Água tipo II estéril
- Dimetilsulfoxido (DMSO) – marca: Sigma
- Solução de Dimetilsulfoxido (DMSO) a 1% v/v
- Solução salina estéril (NaCl) a 0,9%
- Meio Agar Columbia – Marca: Difco
- Meio de cultura Agar Nutriente – Marca Difco
- Meio de cultura Ágar Muller- Hinton – Marca: Oxoid
- Ciprofloxacina (CIP) - (antibiótico) à 5 µg/mL - marca: Sigma-Adrich
- Revelador - cloridrato de 2-*p*-iodophenyl-3-*p*-nitrofenil-5-fenil tetrazolium (INT) à 2 mg/mL – marca: Merck
- Revelador - cloridrato de tri-fenil-tetrazolium (TTC) à 1% 4.2 – marca: Sigma-Adrich

2.3 Local de Realização dos Experimentos

Os ensaios microbiológicos foram realizados no Laboratório de Zoonoses Bacterianas/Setor de *Campylobacter* do Instituto Oswaldo Cruz, pertencente à Fundação Oswaldo Cruz.

2.4 Identificação das Espécies Vegetais e Preparação dos Extratos

Os extratos e frações, bem como os óleos fixos utilizados no estudo foram extraídos, previamente, no Departamento de Química Orgânica da UFRRJ e no Instituto de Química da UFRN, em colaboração com os professores Márcia C. C. de Oliveira e Maria Aparecida M. Maciel, respectivamente.

A isatina e seus derivados, e outras substâncias sintéticas foram previamente preparadas no Departamento de Química Orgânica da UFRRJ sob a orientação da professora Aurea Echevarria. A Tabela 3 mostra as amostras utilizadas neste estudo.

As soluções utilizadas no experimento foram previamente preparadas no Laboratório de Tecnologia Diagnóstica de Bio-Manguinhos (LATED).

Tabela 3. Lista dos extratos, frações, óleos essenciais, substâncias naturais isoladas e sintéticas utilizados no estudo de triagem

Número	Nome	Código	Tipo de Material
1	<i>Croton cajucara</i> Benth (Euphorbiaceae)	CC-EHA	Extrato hidroalcolico bruto das cascas (etanol: água. 9:1)
2	<i>Croton cajucara</i> Benth	F1-7	Óleo fixo (fração hexânica)
3	<i>Croton cajucara</i> Benth (Euphorbiaceae)	F25-27	Óleo fixo 2 (fração hexano: acetato de etila, 9:1)
4	<i>Croton cajucara</i> Benth (Euphorbiaceae)	F28	Fração contendo: maior percentual de t-DCTN comparado com a F 25-27 (fração hexano: acetato 8:2)
5	<i>Croton cajucara</i> Benth	DCTN	<i>Trans</i> -desidroctonina (<i>diterpeno</i>)
6	<i>Croton cajucara</i> Benth	AAA	Ácido acetil aleiturólico (<i>tripterpeno</i>)
7	<i>Croton cajucara</i> Benth	CTN	<i>Trans</i> -crotonina (<i>diterpeno</i> isolado)
9	Benzil-fenil-tiouréia	BEN-H	Derivado da classe das tiouréias
10	Benzil-4-Metoxi-fenil-tiouréia	BEN-OCH ₃	Derivado da classe das tiouréias
11	Benzil-4-nitro-fenil-tiouréia	BEN-NO ₂	Derivado da classe das tiouréias
12	Fenetil	FEN-H	Derivado da classe das tiouréias
13	Fenetil-4-Metóxi-fenil-tiouréia	FEN-OCH ₃	Derivado da classe das tiouréias
14	Fenetil-4-nitro-fenil-tiouréia	FEN-NO ₂	Derivado da classe das tiouréias
15	Isatina comercial	IST	Isatina
16	Isatina -4-cloro-feniltiossemicarbazona	IST-4-Cl-TIO	Derivado da isatina
17	Isatina-4- fluor-feniltiossemicarbazona	IST-4-F-TIO	Derivado de isatina
18	Fenil-sidnona	SID-1	Derivado mesoiônico
19	4-Fluor-fenil-sidnona	SID-2	Derivado mesoiônico
20	4-Cloro-fenil-sidnona	SID-3	Derivado mesoiônico
21	4-Bromo-fenil-sidnona	SID-4	Derivado mesoiônico
22	3-Benzil-sidnona	SID-6	Derivado mesoiônico
23	3-Fenetil-sidnona	SID-7	Derivado mesoiônico
24	<i>Cordia superba</i>	Baba de boi	Extrato bruto etanol: água (9:1)

25	<i>Parthenium hysterophorus</i>	Losna Branca	Extrato em diclorometano
26	<i>Kalonchoe brasilienses</i>	Saião	Extrato bruto etanol: água (9:1)
27	<i>Talinum triangulare</i>	Beldroega	Extrato diclorometano: hidroalcolico
28	<i>Physalis angulata</i>	Physalis	Extrato bruto etanol: água e fração (9:1)
29	<i>Talinum triangulare</i>	Talinum	Extrato etanol: água (9:1)
30	<i>Physalis angulata</i>	Physalis	Extrato bruto etanol: água (9:1)
31	<i>Pyrostegia venusta</i>	Flor de São João	Extrato etanol: água (9:1)
32	<i>Pyrostegia venusta</i>	Folha de São João	Extrato etanol: água (9:1)
33	<i>Ulva fasciata</i> Delile	R1	Extrato: etanol: água (9:1) a frio
34	<i>Ulva fasciata</i> Delile	R2	Extrato em etanol: água (9:1) a quente
35	<i>Ulva fasciata</i> Delile	R3	Extrato em hexano a frio
36	<i>Ulva fasciata</i> Delile	R4	Extrato em hexano a quente
37	<i>Ulva fasciata</i> Delile	R5	Extrato em acetato de etila à quente
38	<i>Ulva fasciata</i> Delile	R6	Extrato em etanol: água (9:1) à quente sem o polissacarídeo ulvana
39	<i>Ulva fasciata</i> Delile	R7	Extrato: fração lipídica

Obs.: Todas as amostras foram utilizadas nos ensaios de triagem na concentração final de 20 µg/mL.

2.5 Solução de Estoque dos Extratos, Frações, Óleos Essenciais, Substâncias Isoladas e Sintéticas

Os estoques dos extratos, frações, óleos essenciais, dos extratos, substâncias naturais isoladas e sintéticas foram pesados e diluídos em solução estéril de Dimetilsulfóxido (DMSO) 1% v/v, onde a concentração final da solução no disco foi de 20 µg/mL (Figura 8-A). Após este procedimento, o material foi aliquoteado em criotubos com volumes de 1 mL e armazenados na geladeira de 2 a 8 °C, protegidos da luz até o momento do uso (Figura 8-B).

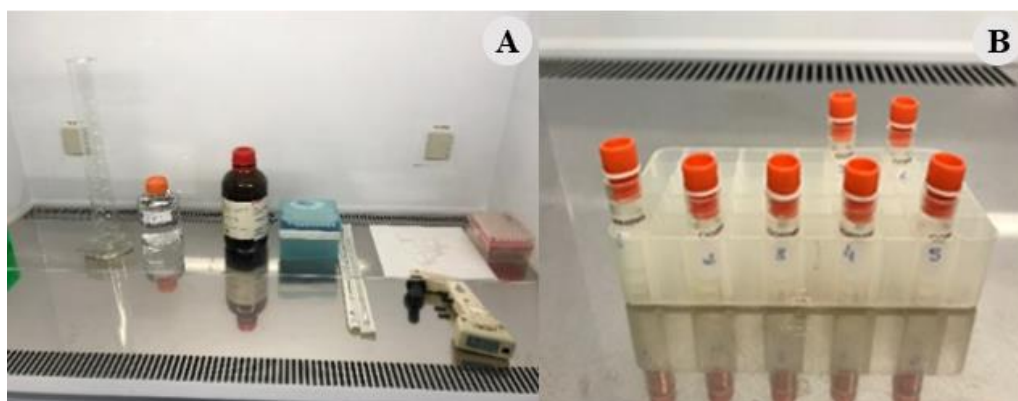


Figura 8. A. Preparação das soluções para diluição das amostras em Cabine de Segurança Biológica; B. Criotubos para armazenamento. Fonte: LATED/BIO-MANGUINHOS.

2.6 Método de Disco-Difusão Usado como Triagem para Observar a Ação Antibacteriana dos Extratos, Frações, Óleos Essenciais, Substâncias Naturais Isoladas e Sintéticas

O teste de Disco-difusão foi realizado em ágar Mueller Hinton (marca Oxoid), segundo a metodologia recomendada pelo Clinical and Laboratory Standard Institute (CLSI, 2018),

utilizando 39 amostras, a fim de observar a atividade antibacteriana das amostras testadas através da formação de um halo de inibição.

3.6.1. Cepas bacterianas escolhidas para o estudo de triagem

As cepas da American Type Culture Collection (ATCC®) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 foram usadas como padrão neste estudo de triagem. Estas se encontram estocadas em um freezer de ultrabaixa temperatura à -70 °C no Laboratório de Zoonoses Bacterianas/ Setor de *Campylobacter*.

3.6.2. Preparação da suspensão de cepas bacterianas

Para a preparação da suspensão bacteriana de *Campylobacter jejuni* ATCC 33560, fornecida pela Coleção de *Campylobacter* (CCAMP), o material foi retirado do freezer e semeado em placas contendo o meio de Ágar Columbia (Difco) acrescido de carvão ou sangue e incubados em estufa à 42 °C por 48 h, em uma jarra com atmosfera de microaerofilia. As cepas de *S. aureus* ATCC 25923 e *E. coli* ATCC 25922 foram semeadas em placas contendo o meio de cultura Ágar Nutriente (Difco) e incubadas à 37°C por 24 h. Após o crescimento, as colônias selecionadas foram transferidas "pescadas" com uma alça estéril para um tubo contendo solução salina, também estéril. As suspensões das cepas bacterianas foram padronizadas em uma turbidez óptica comparável à da solução padrão do tubo 0,5 da escala McFarland, que corresponde a uma suspensão de aproximadamente $1-2 \times 10^8$ UFC/mL (Figura 9).



Figura 9. Cepas padrão de *S. aureus* ATCC 25923, *E. coli* ATCC 25922 e *C. jejuni* ATCC 33560 diluídas em solução salina na escala padrão do tubo 0,5 da escala de McFarland. Fonte: LABZOO/CCAMP.

3.6.3. Semeadura de suspensões bacterianas em placas com meio de cultura de Ágar Mueller Hinton (MH) acrescido de sangue

Com o auxílio de um “swab” esterilizado, as suspensões bacterianas foram semeadas em três direções, na superfície do meio de cultura, a fim de garantir a distribuição uniforme do inóculo no meio. O meio de cultura utilizado para o crescimento foi o Ágar MH acrescido de 5% de sangue de carneiro desfibrinado para as cepas de *Campylobacter*, *S. aureus* e *E. coli*. A semeadura ocorreu dentro de 15 minutos após o ajuste da turbidez, preservando assim a capacidade de replicação das cepas. A semeadura, para cada fração em teste, foi realizada em triplicata (Figura 10).

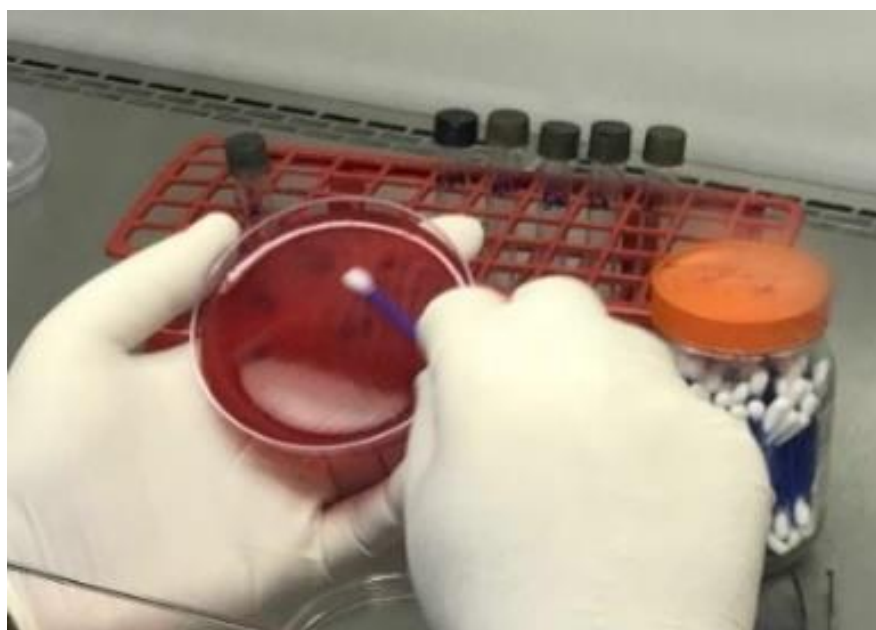


Figura 10. Semeadura de *Campylobacter jejuni* ATCC no meio MH acrescido de sangue.
Fonte: LABZOO/CCAMP.

3.6.4. Impregnação dos discos com as amostras e aplicação nas placas de ágar MH inoculadas com as bactérias

Discos de papel filtro de 6 mm estéreis foram colocados em uma placa de Petri estéril, utilizando uma Cabine de Segurança Biológica, e os discos foram impregnados com 20 µL de cada amostra que foi testada (Figura 11).

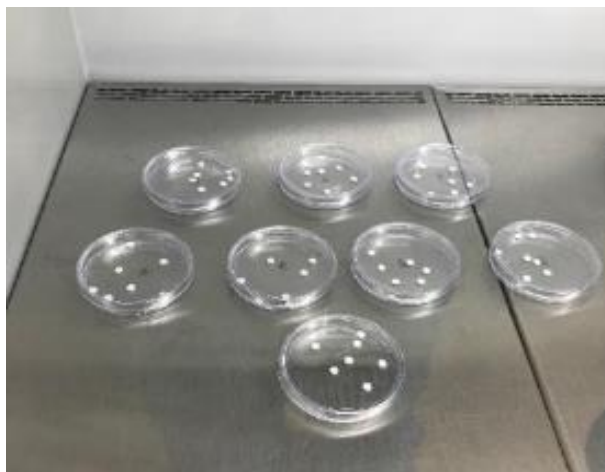


Figura 11. Discos estéreis em placas de petri, onde foram depositados 20 μ L de cada amostra que foi testada. Fonte: LABZOO/CCAMP.

Os discos impregnados com as amostras foram depositados na superfície do meio de cultura das placas previamente inoculadas, com o auxílio de uma pinça. O intervalo entre a impregnação dos discos e seu uso efetivo não excedeu a 20 minutos (Figura 12 A). A distância entre os discos e as bordas da placa de Petri foram de 30 mm, para que os halos de inibição de crescimento não se sobrepusessem. O controle negativo (ausência de halo) foi feito com discos impregnados apenas com Dimetilsulfóxido (DMSO) à 1% v/v e o controle positivo (aparecimento do halo de inibição) foi feito com o disco de antibiótico contendo a Ciprofloxacina à 5 μ g/mL (CIP), da marca Oxoid. As placas foram invertidas e incubadas em estufa à 42 °C por 48 h, em jarras com atmosfera de microaerofilia para o crescimento do *Campylobacter jejuni* ATCC (Figura 12 B). Já para as cepas de *S. aureus* e *E. coli* estas foram incubadas em estufa à 37 °C por 24 h e/ou observadas até 48 h (dependendo da velocidade de crescimento dessas cepas). A leitura do diâmetro dos halos de inibição foi medida em milímetros com o auxílio de uma régua. A zona de inibição foi considerada em relação à área sem crescimento detectável a olho nu, com o mínimo de 7 milímetros.

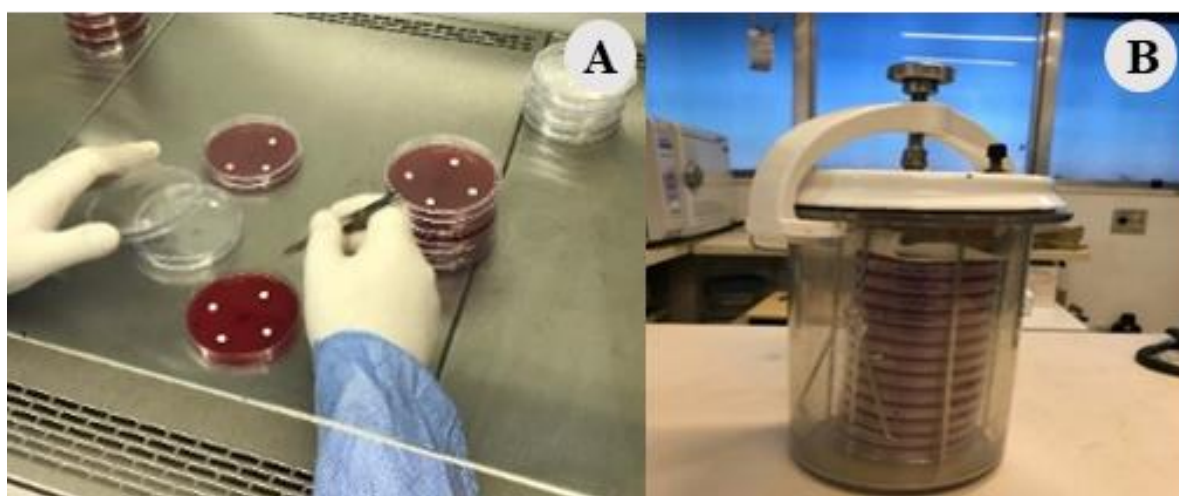


Figura 2. A. Colocação dos discos impregnados com as substâncias testes. Fonte: LABZOO/CCAMP; B. Incubação da cepa de *Campylobacter* em jarra, com atmosfera de microaerofilia, a 42 °C por 48 h. Fonte: LABZOO/CCAMP.

2.7 Teste para a Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC)

As amostras com atividade antibacteriana no método de disco- difusão em ágar foram submetidas ao teste de microdiluição em caldo, a fim de determinar qual a mínima concentração necessária capaz de inibir cepas de *Campylobacter* que apresentavam ou não resistência antimicrobiana. A Tabela 4 indica a relação das cepas de *Campylobacter* spp., sua origem, local e data de isolamento, utilizadas nesta etapa e que foram cedidas pela Coleção de *Campylobacter* (CCAMP), do Instituto Oswaldo Cruz/ FIOCRUZ.

Tabela 4. Relação das Cepas cedidas da Coleção de *Campylobacter* (CCAMP) Laboratório de Zoonoses Bacterianas/ Coleção de *Campylobacter* do Instituto Oswaldo Cruz

	Nº CCAMP	Data de isolamento	Local de isolamento	Origem	Espécie
1	1553	1980	USA	Animal	<i>C. jejuni</i>
2	499	1999	RJ	Humana	<i>C. jejuni</i>
3	1504	2007	RJ	Animal	<i>C. coli</i>
4	1505	2007	RJ	Animal	<i>C. coli</i>
5	1507	2007	RJ	Animal	<i>C. coli</i>
6	1509	2007	RJ	Animal	<i>C. coli</i>
7	1510	2007	RJ	Animal	<i>C. coli</i>
8	1023	2008	RJ	Alimento	<i>C. jejuni</i>
9	1051	2009	RJ	Alimento	<i>C. coli</i>
10	1052	2009	RJ	Alimento	<i>C. coli</i>
11	1057	2009	RJ	Alimento	<i>C. coli</i>
12	1477	2009	RJ	Humana	<i>C. jejuni</i>
13	1062	2010	RJ	Alimento	<i>C. coli</i>
14	1064	2010	RJ	Alimento	<i>C. coli</i>
15	1067	2010	RJ	Alimento	<i>C. coli</i>
16	1490	2011	RJ	Humana	<i>C. jejuni</i>
17	1519	2014	RS	Alimento	<i>C. jejuni</i>
18	1520	2014	RS	Alimento	<i>C. jejuni</i>
19	1521	2014	RS	Alimento	<i>C. jejuni</i>
20	1523	2014	RS	Alimento	<i>C. jejuni</i>
21	1536	2014	RS	Alimento	<i>C. jejuni</i>
22	1543	2014	RS	Alimento	<i>C. jejuni</i>
23	1547	2014	RS	Alimento	<i>C. jejuni</i>
24	1549	2014	RS	Alimento	<i>C. jejuni</i>
25	1552	2014	RS	Alimento	<i>C. jejuni</i>
26	1499	2015	RJ	Humana	<i>C. jejuni</i>
27	1538	2015	RS	Animal	<i>C. jejuni</i>
28	1554	2015	RJ	Animal	<i>C. coli</i>
29	1555	2015	RJ	Animal	<i>C. jejuni</i>
30	1574	2016	RJ	Animal	<i>C. jejuni</i>

Fonte: Laboratório de Zoonoses Bacterianas/ Coleção de *Campylobacter* do Instituto Oswaldo Cruz

2.7.1 Teste de microdiluição em caldo

As concentrações inibitórias mínimas foram determinadas por microdiluição em microplacas de 96 orifícios. Os testes foram feitos em triplicata para cada cepa de *Campylobacter* spp. A isatina foi preparada, previamente, na concentração de 20480 µg/mL

(solução mãe) sendo posteriormente diluída de 1:10 em dimetilsulfoxido (DMSO) a 1% v/v. A concentração final da solução de uso ficou em 2048 µg/mL. Ambas as soluções foram armazenadas na geladeira de 2 a 8 °C.

a) Preparo das microplacas

Foram utilizadas microplacas de 96 orifícios em forma de “U”, já esterilizadas. Nestas microplacas foram adicionados 100 µL, em todos os orifícios, do meio de cultura Caldo Mueller Hinton (Oxoid) preparado e esterilizado previamente. Em seguida, foi adicionado 100 µL da solução contendo a isatina, à concentração de 2048 µg/mL, na primeira linha de cada microplaca. Deste modo, a concentração inicial da isatina, na primeira linha da placa foi de 1024 µg/mL. Posteriormente, foram retirados do primeiro poço 100 µL e adicionados ao segundo poço, onde 7 diluições seriadas de base 2 foram feitas. Assim as concentrações testadas foram 1024 µg/mL, 512 µg/mL, 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL e 8 µg/mL (Figura 13) para todas as 30 cepas de *Campylobacter*. O volume final de cada orifício da placa foi de 100 µL. Para as cepas de *Campylobacter* que apresentaram MIC igual a 8 µg/mL foram feitas diluições adicionais de 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL (Figura 14).

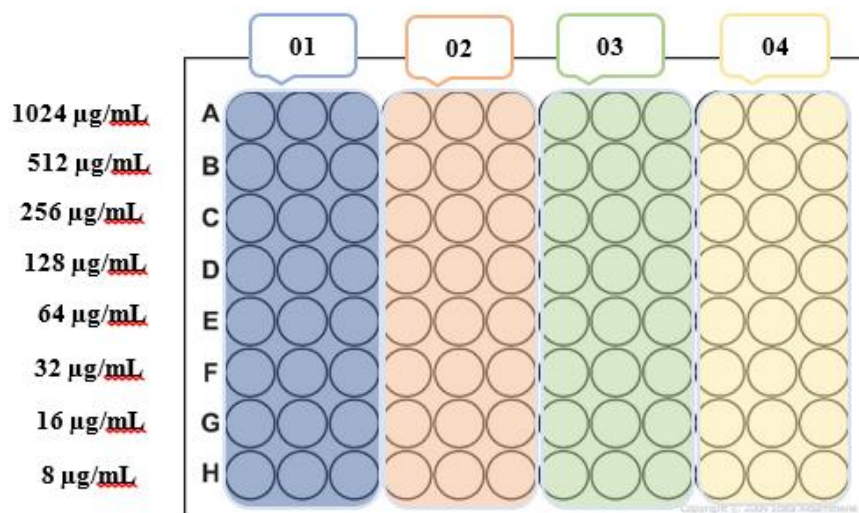


Figura 3. Esquema representativo do Teste de Microdiluição em Caldo, onde as colunas são as cepas 01, 02, 03 e 04 testadas, em triplicata. A concentração do extrato usado está representada.

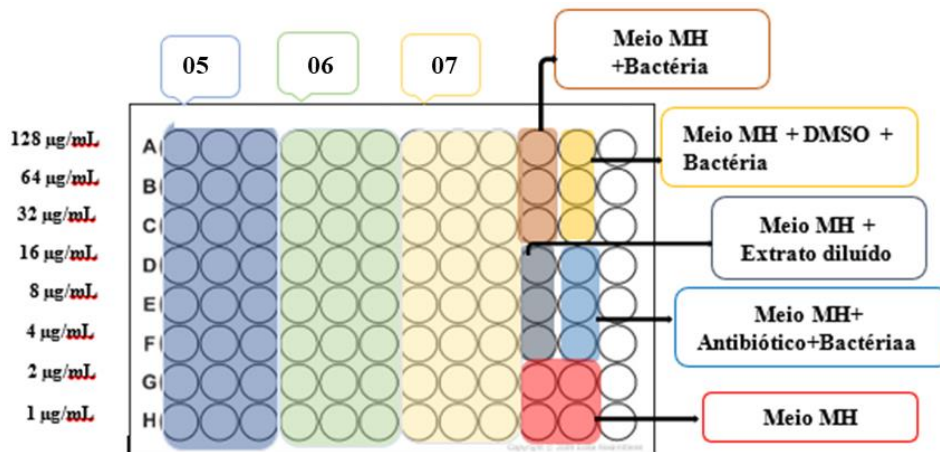


Figura 4. Esquema representativo do Teste de Microdiluição em caldo, onde as colunas são exemplos das cepas de *Campylobacter* spp. testadas, em triplicata, com os controles nas colunas da direita. As concentrações utilizadas da isatina estão representadas pelas linhas.

Legenda: Controles positivos: Meio MH+ Bactéria e Meio MH + DMSO + Bactéria. Controles negativos: Meio MH+ Extrato diluído e só o Meio MH. Controle com antibiótico: Meio MH + Ciprofloxacina à 5 µg/mL mais Bactéria.

b) Preparo das culturas de *Campylobacter* spp.

O inóculo foi preparado transferindo-se colônias de culturas recentes de *Campylobacter*, para tubos contendo solução salina até que a turvação atingisse o equivalente ao tubo 0,5 da escala de MacFarland, correspondendo a $1-2,0 \times 10^8$ UFC/mL. Para a microdiluição em caldo, segundo o CLSI M7A6, 2003, o inóculo precisava ser diluído 1:10 em solução salina, tornando-se uma diluição de 10^7 UFC/mL, mas como cada orifício da microplaca recebeu 5 µL de inóculo, a concentração final foi de 5×10^4 UFC/poço.

c) Preparo dos controles

Os controles utilizados neste experimento foram adicionados a cada poço da microplaca, em triplicata, conforme descrito abaixo, ver Figura 15.

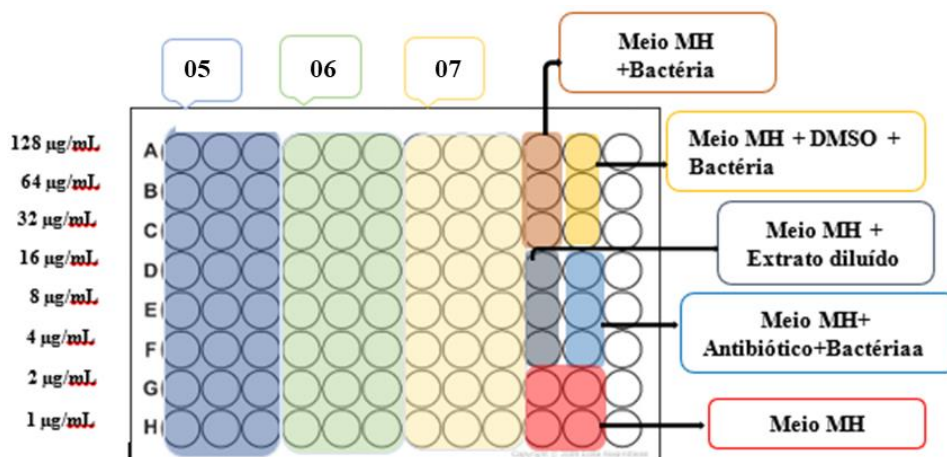


Figura 5. Esquema representativo do Teste de Microdiluição em caldo, onde as colunas são exemplos das cepas de *Campylobacter* spp. testadas, em triplicata, com os controles nas colunas da direita. As concentrações utilizadas da isatina estão representadas pelas linhas. Legenda: Controles positivos: Meio MH+ Bactéria e Meio MH + DMSO + Bactéria. Controles negativos: Meio MH+ Extrato diluído e só o Meio MH. Controle com antibiótico: Meio MH + Ciprofloxacina à 5 µg/mL mais Bactéria.

Controle negativo (ausência de crescimento): somente o meio de cultura em um orifício para ver a esterilidade do meio e no outro orifício o meio de cultura e o extrato diluído em DMSO a 1% v/v para ver a esterilidade dos outros componentes.

Controles positivos (presença de crescimento): adicionou-se em um orifício o meio de cultura e o micro-organismo para ver a viabilidade da bactéria e em outro poço o meio de cultura e mais o DMSO a 1% v/v com o micro-organismo para testar se o DMSO iria interferir no crescimento da bactéria.

Controle com antibiótico (ausência de crescimento): adicionou-se em cada poço da microplaca o meio de cultura e o antibiótico ciprofloxacina, de modo que a concentração final fosse 5 µg/mL e mais a cepa padrão de *Campylobacter* ATCC 33560 que é sensível a este antibiótico.

d) Preparo da solução reveladora e leitura

A solução reveladora de INT (cloridrato de 2-*p*-iodofenil-3-*p*-nitrofenil-5-fenil tetrazolium) à 2 mg/mL foi preparada, diluindo-a em água estéril. Após o período de incubação foi adicionado 10 µL desta solução de INT a cada poço da microplaca e foi incubado novamente na estufa por 30 minutos, na ausência de luz. O aparecimento de uma cor rosa indicou onde ocorreu o crescimento bacteriano. O MIC correspondeu à menor concentração do extrato em que não foi possível verificar o crescimento da bactéria a olho nu (ELOFF, 1998). Para aferição da turvação produzida utilizou-se espectroscopia UV a 595 nm, com o auxílio de um leitor de ELISA

Foi feito, um teste com um outro revelador, o cloridrato de tri-fenil-tretazolium (TTC) a 1%, aplicando 10 µL desta solução aquosa a cada orifício da microplaca. A leitura da atividade foi realizada após o período de incubação de 30 minutos, na ausência de luz, onde uma coloração rosa muito fraca indicou o crescimento da bactéria. Devido a solução já estar pronta

comercialmente, na concentração de 1%, e sendo o recomendado por Eloff (1998) a 20 µg/mL, optamos por não usar mais este revelador.

e) Período de incubação e atmosfera de microaerofilia

Após o preparo da microplaca e adição do micro-organismo, o conteúdo foi homogeneizado com movimentos circulares, durante 1 minuto antes da incubação à 37 °C para 24 h e/ou 48 h, em uma jarra com atmosfera de microaerofilia. A atmosfera de microaerofilia foi feita utilizando o envelope da Gaspak EZ Campy, da Becton Dickinson® (Figura 16).



Figura 6. Jarra para incubação das microplacas de 96 poços, em atmosfera de microaerofilia. Fonte: LABZOO/CCAMP.

2.8 Teste para a Determinação da Concentração Bactericida Mínima (MBC)

A Concentração Bactericida Mínima (MBC) foi determinada a partir dos poços, nos quais não houve crescimento bacteriano visível na microplaca de 96 poços do teste para a determinação da MIC e antes da adição do revelador. A partir dos poços, sem crescimento bacteriano foi retirada uma alíquota de 10 µL, a qual foi inoculada na superfície do ágar Mueller Hinton (marca Oxoid) acrescido de sangue a 5%, e em seguida, após secar por alguns minutos, foram incubadas em uma jarra com atmosfera de microaerofilia a 37°C por até 48 horas. O teste foi feito em triplicata. A leitura foi feita de acordo com a presença ou ausência do crescimento bacteriano e foi definida a MBC como a menor concentração da isatina capaz de causar a morte do micro-organismo, Figura 17.

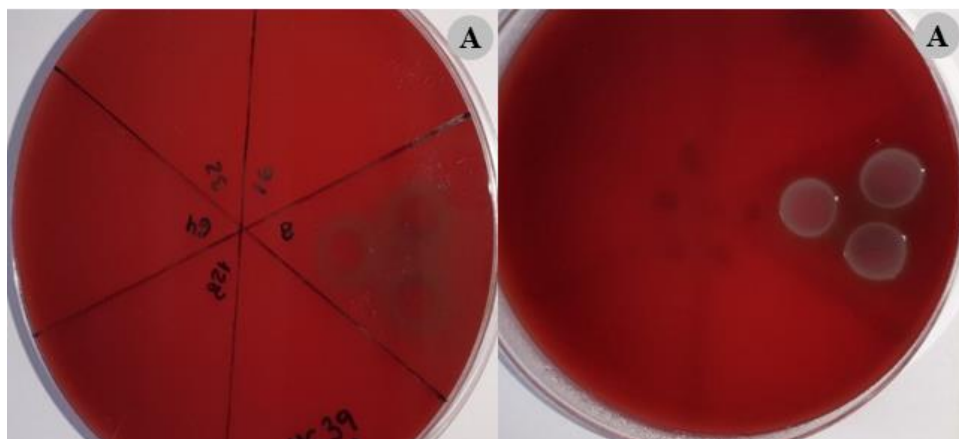


Figura 7. A. Mostra como foi dividida a placa de Ágar MH acrescida de sangue com as concentrações referentes aos MICs, onde não houve turvação; B. Após incubação, o

crescimento bacteriano foi observado na concentração de 8 $\mu\text{g/mL}$. Determinando que a MBC da isatina para esta cepa foi de 16 $\mu\text{g/mL}$.

2.9 Avaliação da Citotoxicidade *In Vitro* por Captação de Vermelho Neutro Utilizada para Determinação do IC_{50}

A citotoxicidade foi avaliada pelo método NRU – Neutral Red Uptake, segundo o Guia 129 da OECD (Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests), com algumas adaptações, como a utilização da linhagem celular MRC-5 e o tempo de exposição para a avaliação em 24, 48 e 72 horas. Foram realizados 3 experimentos independentes.

2.10 Local e Preparação das Células

As células utilizadas foram preparadas na Seção de Controle de Banco de Células de Bio-Manguinhos/FIOCRUZ, na concentração de 25.000 células/ poço/100 μL em meio basal com 10% SFB, com 24 horas de crescimento. Estas células apresentavam ausência de micoplasma e esterilidade atestadas. A Figura 18 mostra a preparação das células até antes da adição da isatina.

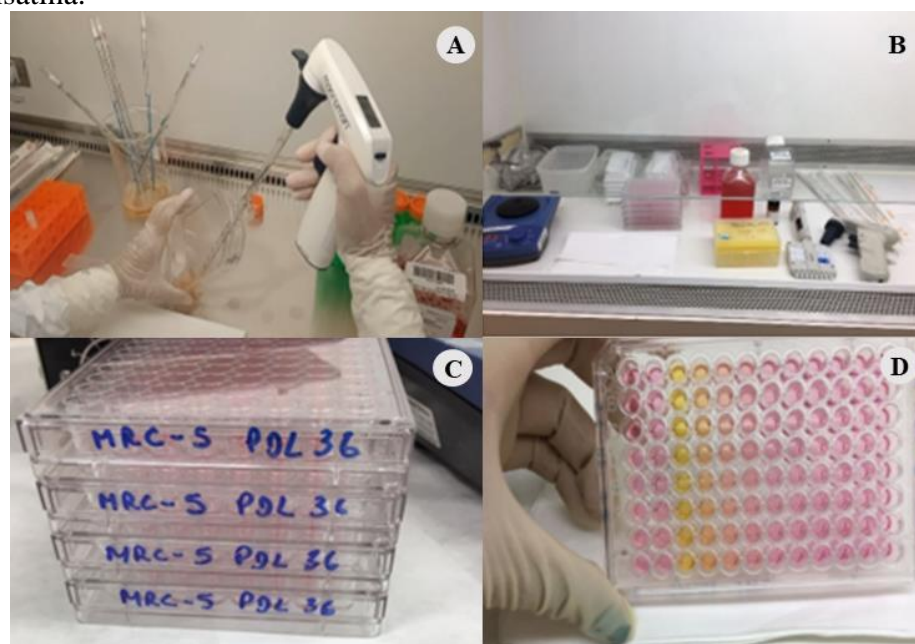


Figura 8. Etapas da preparação das células para o experimento até a adição da isatina. A. Preparação das células MRC-5; B. Preparo das diluições e inoculação na célula MRC-5; C. Placas contendo a célula MRC-5; D. Placa após a inoculação das concentrações com isatina.

2.11 Concentração da Isatina e Controles Utilizados

As concentrações da isatina avaliadas foram: 8 $\mu\text{g/mL}$, 16 $\mu\text{g/mL}$, 32 $\mu\text{g/mL}$, 64 $\mu\text{g/mL}$, 128 $\mu\text{g/mL}$, 256 $\mu\text{g/mL}$, 512 $\mu\text{g/mL}$, 1024 $\mu\text{g/mL}$, sendo 6 replicatas de cada diluição (Figura 19).

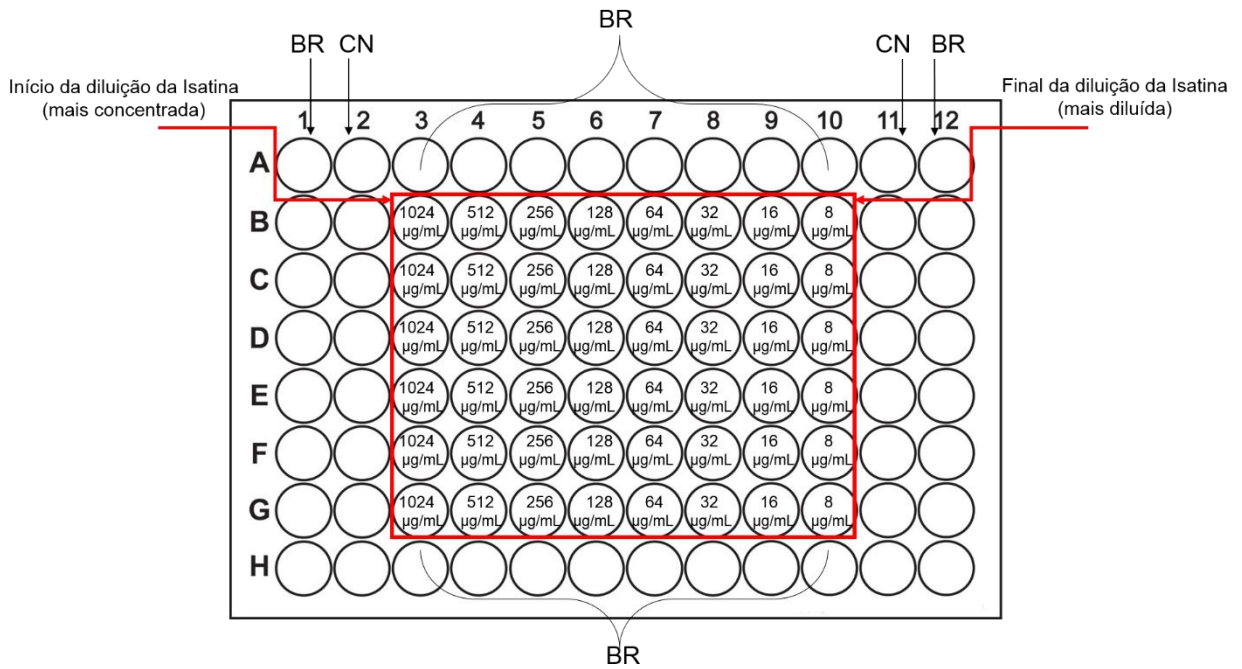


Figura 9. Esquema da placa de 96 poços com a cultura de células em relação as concentrações da isatina e os controles branco e negativo. Legenda: BR-Branco; CN-controle negativo

O controle positivo (CP), de forma a validar o experimento, foi a solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 0,5% em PBS (salina tampão fosfato). As concentrações de SDS avaliadas foram 100 µg/mL, 68,02 µg /mL, 46,28 µg/mL, 31,48 µg/mL, 21,41 µg/mL, 14,57 µg/mL, 9,91 µg/mL e 6,74 µg/mL, sendo 6 replicatas de cada diluição, conforme Figura 20.

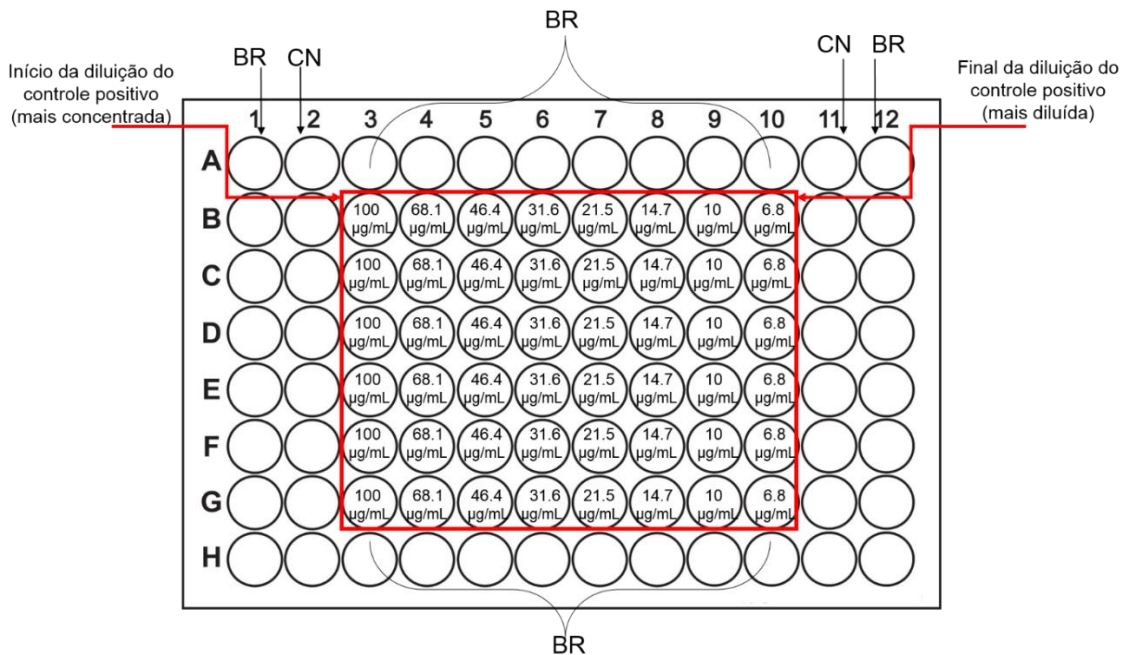


Figura 20. Esquema da placa de 96 poços com a cultura de células em relação as concentrações dos controles positivo, negativo e o branco. Legenda: BR-branco; CN-controle negativo; CP-controle positivo

Os controles negativos (CN), foram os poços com células somente com o meio basal e o branco (BR), os poços sem célula e inoculado com meio basal.

Após o crescimento das células MRC-5 por 24 horas, o meio foi vertido nas placas, com cuidado, sendo o excesso de meio retirado em toalha tipo *wiper* e depois foi inoculado nas células 100 µL da isatina diluída em meio basal sem SFB, o mesmo procedimento foi feito para os controles e o branco.

2.12 Tempo de Exposição da Isatina e Preparo das Células Para a Eluição com o Corante

O procedimento foi realizado em triplicata, sendo 1 placa para cada tempo de exposição da isatina. Os tempos de exposição foram 24, 48 e 72 horas. Após cada tempo de exposição, as células foram observadas ao microscópio, verificando qualquer alteração na morfologia celular, citotoxicidade e contaminação.

O meio das placas foi vertido com cuidado, retirado o excesso de meio em *wiper*. Os poços foram lavados uma vez com 250 µL/poço de PBS pré-aquecido a 37°C. Logo após, foram adicionados 250 µL de vermelho neutro a 25 µg/mL, diluído em meio basal sem SFB e a placa incubada em estufa por 3 horas a 37 °C com 5% CO₂. Após incubação, os poços foram lavados com 250 µL/poço de PBS pré-aquecido a 37 °C. A eluição do corante foi realizada adicionando 100 µL de eluente (etanol 50% + ácido acético 1% + 49% de água) em cada poço. As placas foram mantidas sob agitação por 20-45 minutos protegidas da luz (Figura 21).

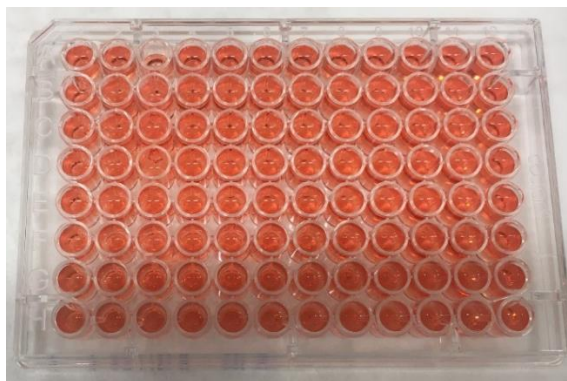


Figura 10. Placa de 96 poços após adição do vermelho neutro.

2.13 Leitura das Absorbâncias e Cálculo dos Valores do IC₅₀

Após a eluição foi realizada a leitura das absorbâncias, dentro de 60 minutos após eluição, em leitora de Microplacas VersaMax[®] da Molecular Devices, em comprimento de onda de 540 nm e os cálculos foram feitos utilizando o programa GraphPad Prism[®].

A realização dos cálculos, considerou a subtração dos valores das DOs (densidade ótica) do branco com os DOs das amostras, o mesmo procedimento foi feito para os controles positivos e negativos. A partir destes valores, a viabilidade celular foi calculada como porcentagem do valor médio de DO do CN. A viabilidade celular foi calculada usando Microsoft Excel[®] conforme a equação:

$$\% \text{ de viabilidade} = \text{DO das concentrações teste} / \text{DO média controle negativo} \times 100$$

O cálculo dos valores de IC_{50} da substância teste foi realizado no GraphPad Prism[®] além de uma análise da função Hill dos dados de viabilidade celular, replicados para cada concentração. A função Hill é recomendada porque todas as informações de dose-resposta são usadas, em vez de alguns pontos ao redor do IC_{50} . A função Hill também fornece a inclinação da curva dose-resposta.

Feita a eluição o corante vermelho neutro se apresenta com a coloração rosa, tanto na placa do CP contendo SDS (Figura 22 A), quanto na placa contendo a isatina (Figura 22 B). Quanto maior a intensidade da cor rosa mais células viáveis aquele determinado aquele poço tem.

Na coluna correspondente ao CN (poços onde tem somente célula e meio), os poços se apresentam com coloração rosa intensa.

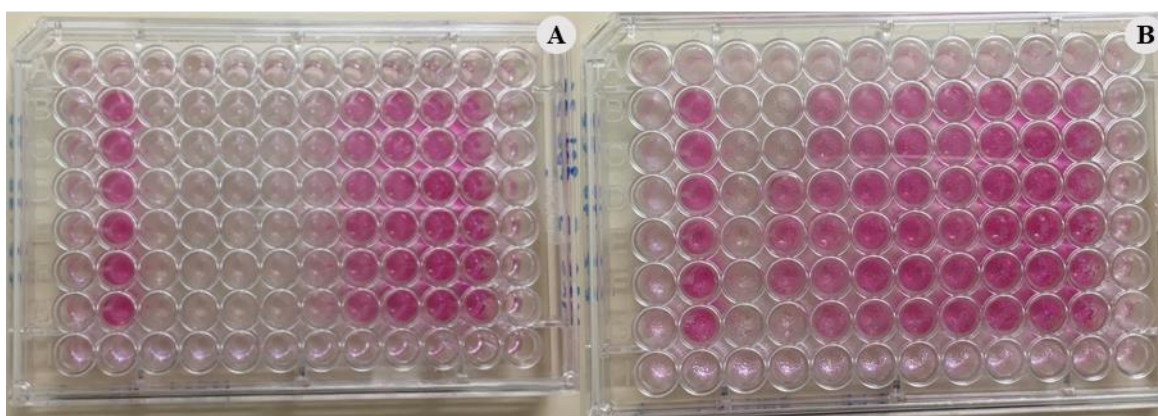


Figura 11. O corante vermelho neutro se apresenta com a coloração rosa. A. Placa contendo SDS (controle positivo) após eluição; B. Placa contendo Isatina após eluição

2.14 Análise Estatística

Os valores de MIC e MBC foram calculados através da média de triplicatas em, no mínimo, três ensaios independentes e com desvio padrão menor do que 5% utilizando o programa Grad Pad Prism 5.0. Os ensaios com a linhagem celular MCR-5 foram realizados com três ensaios independentes e tiveram seus valores de IC_{50} calculados e analisados através do programa estatístico ANOVA, considerando os valores de $p < 0,001$.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste trabalho foi avaliado o efeito de atividade antimicrobiana de extratos, frações, óleos essenciais e substâncias isoladas de espécies vegetais e substâncias sintéticas frente a linhagens de *Campylobacter* spp. A escolha desse gênero foi pelo seu reconhecimento como um dos mais importantes patógenos zoonóticos que infectam humanos, e animais e contaminam alimentos como carnes cruas, leites e frangos etc., intensificando, assim, sua importância na agropecuária. As espécies escolhidas *C. jejuni* e *C. coli* são aquelas que causam a maioria dos casos de infecção por *Campylobacter*, com 95% e 4%, respectivamente (Salimikia et al., 2020). A Campilobacteriose associada a elevada frequência de cepas resistentes como as fluorquinolonas, principalmente na avicultura, tem levado a busca de novas e alternativas estratégias na prevenção, controle e tratamento para a resistência bacteriana, sendo um dos propósitos deste estudo.

3.1 Teste de Triagem (Método de Disco-Difusão)

Inicialmente, foi utilizado o método de disco-difusão como teste de triagem para todas as 39 amostras selecionadas.

As cepas escolhidas foram o padrão da American Type Culture Collection (ATCC®) de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Campylobacter jejuni* ATCC 33560. A seleção das duas primeiras bactérias padrão foi devido a estas serem de crescimento bacteriano rápido e cultivo simples, diferentemente do *Campylobacter* (crescimento em 48 horas, necessidade de atmosfera de microaerofilia e meios cultivos especiais), além disso, serem representantes, um do grupo das Gram-positivas e o outro das Gram-negativas. Quanto a cepa de *Campylobacter jejuni* ATCC 33560 foi a que realmente seria testada para as amostras selecionadas no teste de triagem.

Os resultados obtidos pelo método de disco-difusão, após a análise das 39 amostras mostraram que a isatina apresentou o melhor desempenho (Figura 23).

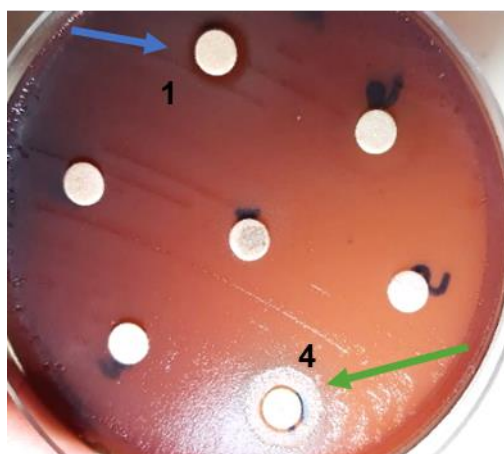


Figura 12. Halos de inibição frente a cepa de *C. jejuni* (ATCC33560) nas amostras 1 e 4 correspondentes a isatina (IST), respectivamente. Fonte: LABZOO/CCAMP.

Posteriormente, a partir do resultado verificado com a isatina nos ensaios de triagem, prosseguiu-se com a determinação dos valores do MIC frente as demais bactérias selecionadas na coleção CCAMP (Tabela 4) das amostras que apresentaram resultados positivos.

Extratos e frações das espécies vegetais (Tabela 3) foram avaliadas frente a cepa de *C. jejuni* (ATCC 33560), sendo que destas 4 espécies, *Pyrostegia venusta* (folha de São João), *Kalonchoe brasilienses* (Saião) e *Ulva fasciata* - R6 (extrato bruto em etanol: água a quente sem o polissacarídeo ulvana da macroalga verde) e R7 (fração lipídica do extrato da macroalga verde) apresentaram grandes halos de inibição. Entretanto, houve também um crescimento, na parte interna do halo, de algumas ‘colônias satélites’, as quais foram submetidas a coloração de Gram, com o objetivo de avaliar a pureza do inóculo e qual era a bactéria que havia crescido nos referidos halos sendo observado células compatíveis com *Campylobacter* (Tabela 5 e Figura 24). A presença dessas ‘colônias satélites’ de *Campylobacter* no halo de inibição de crescimento indicam que algumas células mutantes resistem à ação desses extratos utilizados. Estes mutantes existem normalmente na população bacteriana, e o seu aparecimento não é induzido, mas ocorre devido ao fenômeno de mutação espontânea.

Tabela 5. Resultados obtidos para o efeito antimicrobiano dos extratos de *Kalonchoe brasilienses* (Crassulaceae), *Pyostegia venusta* (Bignoceaceae), *Ulva fasciata* - R6 (extrato bruto a quente sem o polissacarídeo ulvana) e *Ulva fasciata* - R7 (fração lipídica) na concentração de 20 µg/mL

Extratos	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. jejuni</i>
	ATCC25922	ATCC25923	ATCC 33560
Halo de inibição (mm)			
<i>Kalonchoe brasilienses</i> (Saião)	Negativo	Negativo	19
<i>Pyostegia venusta</i> (Folha de São João)	Negativo	Negativo	24
R6 - extrato bruto a quente de <i>Ulva fasciata</i>	Negativo	Negativo	15
R7 – fração lipídica de <i>Ulva fasciata</i>	Negativo	Negativo	13
Sol. de Dimetilsulfóxido à 1% v/v (Padrão Negativo)	Negativo	Negativo	Negativo
Disco comercial de Ciprofloxacina à 5 µg/mL (Padrão positivo)	SIM	SIM	24



Figura 13. “Colônias satélites” de *C. jejuni* que cresceram dentro do halo de inibição. Fonte: LABZOO/CCAMP

O potencial da atividade antibacteriana com estes extratos e frações das espécies vegetais acima citadas, já tem sido relatado na literatura para algumas espécies bacterianas. No entanto, para as espécies de *Campylobacter* os estudos são escassos.

Nos estudos sobre a *Kalonchoe brasilienses*, Mayorga e colaboradores (2019), observaram que está é uma fonte natural de flavonoides e flavonas e são agentes promissores antioxidantes e antibacterianos. Os extratos hidroetanólicos (70%) da *Kalonchoe brasilienses* foram os mais ativos frente a oito bactérias padrão ATCC, cinco *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina e cinco cepas clínicas de *Salmonella* testadas. Apresentando ação bacteriostática de 5000 µg/mL. Estes extratos, de acordo com os dados observados no “time-kill” foram capazes de reduzir a taxa de crescimento de *Salmonella* causando danos à integridade da membrana celular e/ou alterações de permeabilidade, sugerindo o potencial antibacteriano da *Kalonchoe brasilienses* no desenvolvimento de novos antibióticos e aplicações terapêuticas inovadoras.

A espécie *Pyrostegia venusta* foi estudada por Purabi e colaboradores (2012) e, também, apresentou atividade antimicrobiana moderada e promissora frente as bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Staphylococcus epidermidis*, *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes*, *Micrococcus luteus*) e Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella typhi* e *Pseudomonas aeruginosa*) e frente aos fungos *Candida albicans*, *C. tropicana* e *Aspergillus niger*.

A macroalga verde *Ulva fasciata* apresentou atividade antiviral no estudo de GARG e colaboradores em 1992 e, mais recentemente, Chakraborty e colaboradores (2010) investigaram a sua atividade antibacteriana, observando que houve inibição do crescimento do *Vibrio parahaemolyticus*, uma bactéria Gram-negativa encontrada em água doce e salgada que causa gastroenterites em humanos.

A isatina apresentou halo de inibição do crescimento maior (28 mm) do que os apresentados pelo controle positivo do antibiótico ciprofloxacina (22 mm), sugerindo uma tendência de efetividade frente ao *C. jejuni* ATCC 33560. A *E. coli* ATCC apresentou também um halo de inibição (7 mm), só que muito pequeno em relação a *C. jejuni* ATCC. Já para *S. aureus* ATCC 25922 não houve o aparecimento de halo, bem como para os derivados da isatina, conforme apresentado na Tabela 6.

Tabela 6. Resultados das amostras contendo a isatina e seus derivados frente as bactérias padrões de ATCC de *S. aureus*, *E. coli* e *C. jejuni* na concentração de 20 µg/mL

Amostras	Código	<i>S. aureus</i>	<i>E. coli</i>	<i>C. jejuni</i>
		ATCC25922	ATCC25923	ATCC 33560
Halo de inibição (mm)				
Isatina	IST	Negativo	7	28
Isatina-4-cloro-feniltiossemicarbazona	IST-4CI-TIO	Negativo	Negativo	Negativo
Isatina-4-flúor-feniltiossemicarbazona	IST-4-F-TIO	Negativo	Negativo	Negativo
Sol. de Dimetilsulfóxido à 1% v/v (Padrão -)	DMSO	Negativo	Negativo	Negativo
Disco comercial de Ciprofloxacina à 5µg/mL (Padrão +)	CIP	18	26	22

Os resultados observados neste trabalho mostraram de forma preliminar o desempenho da isatina (IST) frente as bactérias Gram-negativas como *C. jejuni* e *E. coli*. Relatos na literatura também tem mostrado esse desempenho da isatina e seus derivados, com potencial atividade antibacteriana. Um desses relatos foi feito por Vandana e colaboradores (2017) que descreveram uma visão geral de alguns estudos mostrando atividades antibacterianas para

Staphylococcus aureus, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhi* e antifúngicas para *Aspergillus niger* e *Candida albicans* de vários compostos semi-sintéticos a partir da isatina.

Uma mini-revisão realizada por Guo e colaboradores (2019) relataram diversos derivados de isatina com um amplo perfil farmacológico como a isatina-azole, isatina-quinolina/quinolona, isatina-furano/coumarina, isatina hidrazona/ (tio) semicarbazona e dímeros de isatina e híbridos de isatina-indol. Estes apresentaram potencial antibacteriano para diversas espécies *in vitro* e *in vivo*, que poderiam ser usados no desenvolvimento de derivados isatina com espectro mais amplo, maior potência, menor toxicidade e múltiplos mecanismos de ação.

Em nosso estudo, ao contrário do que se tem visto na literatura, não foi observado halo de inibição em relação a bactéria Gram-positiva *S. aureus* para os derivados da isatina testados.

No entanto, estudos com a isatina em *Campylobacter* não foram encontrados na literatura, apesar do levantamento de 27 artigos feito por Salimikia e colaboradores (2020) confirmando o efeito anti-*Campylobacter* em 71 plantas medicinais estudadas em mais de 10 países.

Os resultados negativos (ausência de halo) de Isatina-4-cloro-feniltiossemicarbazona (IST-4Cl-TIO) e a isatina-4-flúor-feniltiossemicarbazona (IST-4-F-TIO) podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles, podemos citar alguns que poderiam possivelmente interferir na ausência de halo como a metodologia aplicada, e o desconhecimento do mecanismo de ação dos derivados da isatina, pela ausência de pesquisas com *Campylobacter*.

A avaliação preliminar da atividade antibacteriana aplicada neste estudo foi o método de difusão em disco que é um teste aceito pela FDA (Food and Drug Administration) e estabelecido como padrão pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) e muito utilizado para analisar agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos. O método de difusão em ágar, é um método físico, no qual um micro-organismo é desafiado frente a uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólida e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo desafiado com a difusão da substância ensaiada (Ostrosky, 2008). Entretanto, apesar de ser um método muito utilizado, com as vantagens de uso de pequenos volumes e possibilidades de testar várias amostras por placa frente a um único micro-organismo, no caso dos dois derivados da isatina, a difusão destas amostras no ágar, pode não ter sido efetiva, outra metodologia poderia futuramente ser testada, em meios líquidos, para a confirmação do resultado.

De acordo com a literatura descrita por Beraldo (2004), as tiossemicarbazonas atuam inibindo o crescimento de bactérias Gram-positivas, como *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus faecalis* e *D. enterococcus*, mas não apresentam mesma efetividade de inibição com as bactérias Gram-negativas, como *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pseudomonas*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Shigella*, *Escherichia coli* e *Proteus*. Portanto, ao contrário do relatado pelo autor, no nosso estudo não houve formação de halo de inibição nas cepas Gram-negativas e nem na Gram-positiva *S. aureus* ATCC, necessitando de mais estudos destas substâncias.

A ausência de pesquisas sobre mecanismo de ação da isatina e seus derivados, com *Campylobacter* dificulta a nossa compreensão, mas alguns mecanismos, têm sido citados por vários autores, principalmente em óleos essenciais. Segundo uma revisão feita por Micciche e colaboradores (2019) grande parte dos mecanismos associados às atividades antimicrobianas de óleos essenciais (EOs) são elucidados a partir de micro-organismos que não o *Campylobacter*, e, portanto, suposições sobre *Campylobacter* ainda precisam de mais estudos. De forma geral, os mecanismos associados aos EOs foram amplamente descritos por Nazzaro et al., (2013) e O'Bryan et al., (2015) mostrando a alteração em proteomas e na morfologia celular de bactérias patogênicas. Um mecanismo proposto para *Campylobacter* é

o seu potencial para ruptura da membrana externa e a morte da célula, segundo O'Bryan e colaboradores (2015) atribuindo a hidrofobicidade dos EOs, os lipídios de membrana externa podem ser perturbados, rompidos ou penetrados, permitindo assim, um aumento de permeabilidade (Fisher & Phillips, 2009; Brenes e Roura, 2010; Guinoiseau et al., 2010). Este mecanismo de ação proposto para *Campylobacter* também foi confirmado por Ingok ID & Guler (2017), que estudaram os óleos essenciais de cardamomo, cominho e erva “dill” frente ao *Campylobacter spp.* Neste estudo foram feitas a avaliação da permeabilidade e da integridade da membrana celular, através da determinação da condutividade elétrica relativa e da liberação dos constituintes de células em sobrenadante a 260 nm, respectivamente, bem como a medição da concentração de ATP extracelular. O aumento da condutividade elétrica relativa, da concentração de ATP extracelular e a liberação de constituintes celulares após o tratamento com OEs demonstrou que estes afetaram a integridade da membrana celular do *Campylobacter*.

Além disso, de acordo Burt (2004) e Diaz-Sanchez e colaboradores (2015) a atividade antimicrobiana não pode ser atribuída a um único e específico mecanismo, sendo provável que múltiplos mecanismos são responsáveis pelo efeito dos EOs frente aos patógenos, incluindo o *Campylobacter*. Diversos mecanismos de ação sobre as bactérias têm sido descritos, segundo Nazzaro e colaboradores (2013), para explicar a atividade do EOs na célula bacteriana que incluem a degradação da parede celular, danos a membrana citoplasmática, coagulação do citoplasma, danos a membrana proteica, extravasamento ou saída do conteúdo da célula, redução da força motora dos prótons e síntese de ATPases sendo uma área relevante para pesquisas futuras.

No entanto, os óleos essenciais avaliados neste trabalho não apresentaram atividade frente à *Campylobacter* padrão e, também, frente às bactérias *S. aureus* e a *C. coli*.

Os inúmeros relatos na literatura sobre derivados de isatina, têm atraído grande interesse na química medicinal devido ao seu potencial biológico e suas amplas atividades farmacológicas (HALL et al., 2011, TENG et al., 2016). Portanto, com os nossos resultados obtidos no decorrer dos ensaios de triagem, com a constatação da atividade anti-*Campylobacter* da isatina prosseguiu-se com a análise desta frente a outras linhagens de *Campylobacter spp.* de diversas origens (humana, animal e alimentos), diferentes períodos de isolamento, espécies diferentes (*C. jejuni* e *C. coli*) e apresentando resistência aos antimicrobianos ou não.

3.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) e Concentração Bactericida Mínima (MBC)

Preliminarmente aos ensaios para determinação do MIC foi realizado um teste de cultivo em microplacas de 96 poços sem a isatina e foi verificado que houve crescimento satisfatório (CLSIb, 2018) do *Campylobacter*. ATCC em todos os orifícios incubados em estufa a 37 °C, sob atmosfera de microaerofilia durante 24 horas. E, também, nas culturas de 48 horas não foi observada diferença significativa na leitura. Portanto, foi definido que o tempo de incubação seria de 24 horas.

Houve a necessidade de avaliar os reveladores TTC e INT utilizados na metodologia para obtenção dos valores de MIC. Os resultados foram satisfatórios quando comparados com poços que não havia cultivo bacteriano e sendo eficazes em detectar a atividade respiratória do *Campylobacter*. Optou-se por escolher o revelador INT, embora o TTC também tenha se mostrado eficiente, mas a intensidade da coloração do INT foi bem mais intensa, de modo que pode ser identificado de forma visual.

A adição de 5 µL ou 10 µL do inóculo contendo a bactéria também foi avaliada e não apresentou diferença em relação ao crescimento da bactéria. Portanto foi definido que o volume do inóculo seria de 5 µL.

Nos ensaios de microdiluição em caldo, onde são mostradas de maneira representativa as microplacas de 96 poços (Quadro 1).

Quadro 1. Esquema representativo da microplaca de 96 poços com os testes controles realizados, sem a isatina, a fim de verificar o crescimento do *Campylobacter* na presença dos reveladores INT e TTC e do volume do inóculo ideal de 5 µL ou 10 µL

	5 µL MØ						10 µL MØ					
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	MHB	MHB	MHB-TTC	MHB-TTC	MHB-INT	MHB-INT	MHB	MHB	MHB-TTC	MHB-TTC	MHB-INT	MHB-INT
B	MHB	MHB	MHB-TTC	MHB-TTC	MHB-INT	MHB-INT	MHB	MHB	MHB-TTC	MHB-TTC	MHB-INT	MHB-INT
C	MHB	MHB	MHB-TTC	MHB-TTC	MHB-INT	MHB-INT	MHB	MHB	MHB-TTC	MHB-TTC	MHB-INT	MHB-INT
D	MHB	MHB	MHB-TTC	MHB-TTC	MHB-INT	MHB-INT	MHB	MHB	MHB-TTC	MHB-TTC	MHB-INT	MHB-INT
E	MH	MH	MH-TTC	MH-TTC	MH-INT	MH-INT						
F	MH	MH	MH-TTC	MH-TTC	MH-INT	MH-INT						
G												
H												

Legenda: MØ: inóculo da bactéria, correspondente à concentração de 10^5 UFC/mL de *C. jejuni* ATCC 33560; MH: 100 µL de meio de cultura Caldo Mueller Hinton; MHB-TTC: 100 µL de meio de cultura caldo Mueller Hinton + 5 µL ou 10 µL de bactéria + 10 µL de TTC; MHB-INT: 100 µL de meio de cultura caldo Mueller Hinton + 5 µL ou 10 µL de bactéria + 10 µL de INT; MHB: Meio de cultura caldo Mueller Hinton + 5 µL ou 10 µL de bactéria; MH-TTC: 100 µL de meio de cultura caldo Mueller Hinton + 10 µL de TTC; MH-INT: 100 µL de Meio de cultura caldo Mueller Hinton + 10 µL de INT.

Os resultados da Concentração Mínima Inibitória (MIC) dos ensaios realizados em microplacas de 96 poços com a isatina são observados nas Figuras 25 A, B e C.

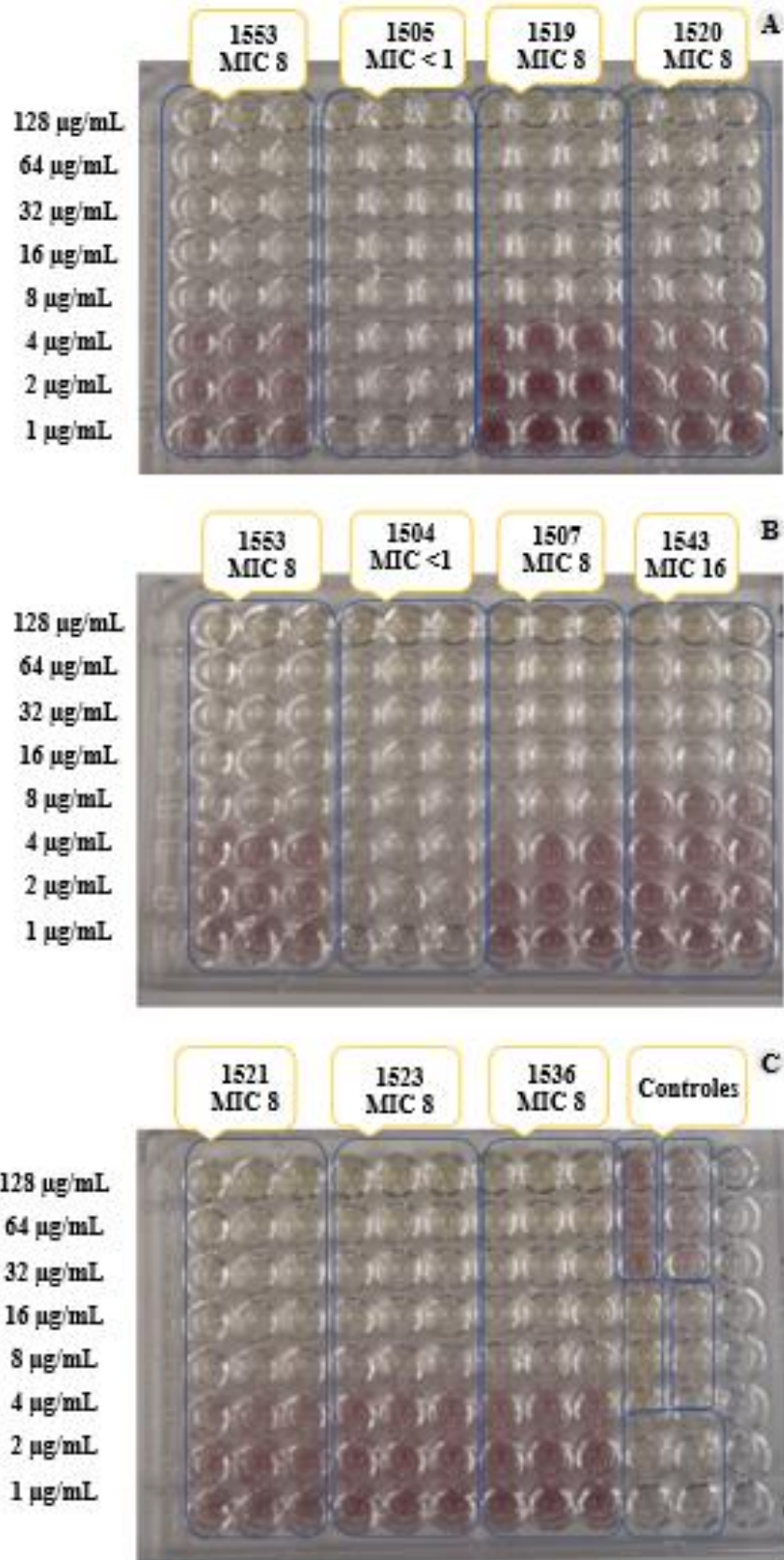


Figura 14. Ensaios de microdiluição em caldo frente a interação das cepas de *Campylobacter* spp. com as diluições de isatina. A leitura do MIC equivale a menor concentração onde houve a inibição do crescimento (ausência de cor rosa).

A leitura da densidade óptica (D.O.) foi realizada em todas as microplacas de 96 poços, logo após a leitura visual com o revelador. Na Tabela 7, são observados os valores da D.Os nos ensaios com a cepa de *Campylobacter* ATCC utilizada como controle, nas quatro vezes em que foram feitos os experimentos. Os resultados dos controles negativos (sem crescimento), positivos (presença de crescimento) e controle com antibiótico (ausência de crescimento) também constam na Tabela 07. Os resultados das D.Os das 29 linhagens de *Campylobacter* são observados na Tabela 8. Como o teste foi feito em triplicata, os valores que constam nas tabelas 7 e 8 são a média aritmética das três leituras. O valor da D.O. considerado como positivo (com presença de crescimento bacteriano) foi $\geq 0,153$.

Tabela 7. Leitura da densidade óptica dos controles usados no teste da MIC

CCAMP (DATA)	Concentração da Isatina por µg/mL								MIC
	128	64	32	16	8	4	2	1	
1553 (30/08/19)	0,061	0,048	0,048	0,050	0,069	0,295	0,309	0,495	8,0
1553 (06/09/19)	0,048	0,049	0,046	0,052	0,079	0,316	0,322	0,444	8,0
1553 (13/09/19)	0,047	0,045	0,047	0,048	0,053	0,230	0,514	0,452	8,0
1553 (10/10/19)	0,040	0,030	0,030	0,040	0,070	0,370	0,640	0,790	8,0
DATA	Meio cultura+ Bactéria ATCC	Meio cultura + DMSO + Bactéria ATCC	Meio cultura + Isatina	Meio cultura + Ciprofloxacina + Bactéria ATCC	Meio cultura				
30/08/19	0,335	0,153	0,051	0,051	0,050				
06/09/19	0,406	0,214	0,050	0,055	0,049				
13/09/19	0,540	0,220	0,066	0,050	0,055				
10/10/19	0,773	0,230	0,030	0,040	0,040				
	Crescimento bacteriano	Crescimento bacteriano	Sem crescimento	Sem crescimento	Sem crescimento				

Tabela 8. Leitura da Densidade Óptica (595 nanômetros) da MICs das linhagens de *Campylobacter*

Leitura da Densidade Óptica (595 nanômetros) da MICs das linhagens de *Campyloter*

N° CCAMP	Concentração da Isatina por µg/mL								MIC
	128	64	32	16	8	4	2	1	
499	0,030	0,030	0,040	0,040	0,040	0,160	1,070	1,100	8,0
1504	0,046	0,047	0,045	0,049	0,047	0,053	0,100	0,083	<1,0
1505	0,048	0,047	0,047	0,048	0,048	0,050	0,064	0,077	<1,0
1507	0,044	0,048	0,049	0,047	0,054	0,430	0,830	0,847	8,0
1509	0,046	0,047	0,043	0,047	0,051	0,209	0,227	0,256	8,0
1510	0,046	0,047	0,046	0,050	0,055	0,356	0,563	0,403	8,0
1023	0,047	0,048	0,049	0,046	0,087	0,401	0,714	0,699	8,0
1051	0,048	0,047	0,057	0,051	0,057	0,230	0,694	0,768	8,0
1052	0,047	0,049	0,052	0,050	0,080	0,802	0,822	0,861	8,0
1057	0,048	0,048	0,051	0,051	0,050	0,294	0,513	0,546	8,0
1477	0,049	0,046	0,056	0,048	0,048	0,156	0,235	0,279	8,0
1062	0,046	0,048	0,048	0,051	0,086	0,748	1,604	1,815	8,0
1064	0,048	0,049*	0,048	0,050	0,047	0,374	0,515	1,869	8,0
1067	0,045	0,045	0,055	0,048	0,054	0,283	0,325	0,407	8,0
1490	0,030	0,030	0,040	0,050	0,250	0,690	0,840	0,890	16,0
1519	0,045	0,049	0,048	0,050	0,049	0,509	0,800	0,937	8,0
1520	0,052	0,051	0,051	0,048	0,064	0,354	0,462	0,654	8,0
1521	0,046	0,045	0,048	0,048	0,076	0,238	0,360	0,375	8,0
1523	0,046	0,050	0,046	0,047	0,099	0,452	0,596	0,650	8,0
1536	0,043	0,045	0,051	0,048	0,062	0,379	0,611	0,644	8,0
1543	0,045	0,047	0,047	0,048	0,377	0,445	0,538	0,531	16,0
1547	0,042	0,043	0,047	0,051	0,268	0,182	0,218	0,252	16,0
1549	0,046	0,044	0,044	0,046	0,265	0,481	0,542	0,587	16,0
1552	0,047	0,053	0,049	0,049	0,413	0,342	0,407	0,392	16,0
1499	0,051	0,048	0,051	0,061	0,054	0,294	0,328	0,277	8,0
1538	0,030	0,030	0,030	0,040	0,010	0,790	1,350	1,480	8,0
1554	0,044	0,049	0,048	0,047	0,049	0,398	0,979	0,918	8,0
1555	0,048	0,052	0,049	0,052	0,065	0,624	1,097	1,290	8,0
1574	0,047	0,049	0,047	0,049	0,052	0,154	0,678	0,965	8,0

A Concentração Mínima Inibitória (MIC) foi definida como a menor concentração da isatina em µg/mL capaz de impedir o crescimento da linhagem de *Campylobacter* estudada. Portanto, a determinação da MIC teve como objetivo avaliar quantitativamente o potencial antibacteriano da isatina em cepas de *Campylobacter* isoladas com características diversificadas, incluindo cepas com multirresistência antimicrobiana. Com base nos resultados obtidos para as MICs (Tabela 8) das diferentes cepas de *Campylobacter* podemos destacar que a isatina apresenta intenso efeito antibacteriano com valores menores que MIC < 1 µg/mL (7%) para duas cepas CCAMP1504 e CCAMP1505 provenientes de fonte animal, ambas isoladas no Rio de Janeiro em 2007, da espécie *C. coli* e valores no máximo de 16 µg/mL (17%) para cinco cepas CCAMP 1490, CCAMP1543, CCAMP1547, CCAMP1549 e CCAMP1552, sendo estas quatro últimas de origem alimentar da espécie *C. jejuni* isolada em 2014 do Rio Grande do Sul e a cepa a CCAMP1490 de origem humana, da espécie *C. jejuni* isolada em 2011, no Rio de Janeiro.

Os resultados do MIC da isatina mostraram que a maioria apresentou MIC = 8,0 µg/mL, o que equivale a 23 (76 %) das cepas testadas. Dentre essas, 13 (43%) cepas da espécie *C. jejuni* provenientes tanto do Rio de Janeiro quanto do Rio Grande do Sul isoladas de fontes diversas (alimento, animal e humana) no período entre 1980 e 2016 e 10 (33%) cepas de *C. coli*, todas do Rio de Janeiro, isoladas de animais e alimentos no período entre 2007 e 2015.

Quanto a relação entre os resultados da MIC e o perfil de resistência das cepas de *Campylobacter* selecionadas previamente, podemos notar que tanto as cepas totalmente sensíveis aos antimicrobianos, inclusive a amostra de *Campylobacter* ATCC, quanto as cepas resistentes a ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina não apresentaram diferenças em relação a susceptibilidade antimicrobiana no teste com a isatina (Tabela 9).

Tabela 8. Relação dos resultados obtidos para as cepas de *C. jejuni* e *C. coli* analisadas no teste para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (MIC) em microplaca com a isatina e Concentração Bactericida Mínima (MBC)

N° CCAMP	Data de isolamento	Local de isolamento	Origem	Espécie	Perfil de Resistencia	MIC (µg/mL)	MBC (µg/mL)	
1	1553	1980	ATCC	AN	<i>C. jejuni</i>	Sensível	8,0*	16,0
2	499	1999	RJ	HU	<i>C. jejuni</i>	CIP-ERI-TT	8,0	16,0
3	1504	2007	RJ	AN	<i>C. coli</i>	CIP-ERI-TT	<1,0	<1,0
4	1505	2007	RJ	AN	<i>C. coli</i>	CIP-ERI-TT	<1,0	<1,0
5	1507	2007	RJ	AN	<i>C. coli</i>	CIP-ERI-TT	8,0	16,0
6	1509	2007	RJ	AN	<i>C. coli</i>	CIP-ERI-TT	8,0	8,0
7	1510	2007	RJ	AN	<i>C. coli</i>	CIP-ERI-TT	8,0	8,0
8	1023	2008	RJ	AL	<i>C. jejuni</i>	CIP-TT	8,0	16,0
9	1051	2009	RJ	AL	<i>C. coli</i>	Sensível	8,0	16,0
10	1052	2009	RJ	AL	<i>C. coli</i>	Sensível	8,0	16,0
11	1057	2009	RJ	AL	<i>C. coli</i>	Sensível	8,0	16,0
12	1477	2009	RJ	HU	<i>C. jejuni</i>	CIP-ERI-TT	8,0	16,0
13	1062	2010	RJ	AL	<i>C. coli</i>	CIP-ERI-TT	8,0	8,0
14	1064	2010	RJ	AL	<i>C. coli</i>	Sensível	8,0	8,0
15	1067	2010	RJ	AL	<i>C. coli</i>	CIP	8,0	8,0
16	1490	2011	RJ	HU	<i>C. jejuni</i>	CIP-TT	16,0	16,0
17	1519	2014	RS	AL	<i>C. jejuni</i>	CIP-ERI-TT	8,0	8,0
18	1520	2014	RS	AL	<i>C. jejuni</i>	CIP-ERI-TT	8,0	16,0
19	1521	2014	RS	AL	<i>C. jejuni</i>	CIP-ERI-TT	8,0	16,0
20	1523	2014	RS	AL	<i>C. jejuni</i>	CIP-ERI-TT	8,0	16,0
21	1536	2014	RS	AL	<i>C. jejuni</i>	CIP-ERI-TT	8,0	16,0
22	1543	2014	RS	AL	<i>C. jejuni</i>	CIP-ERI	16,0	16,0
23	1547	2014	RS	AL	<i>C. jejuni</i>	CIP-ERI	16,0	16,0
24	1549	2014	RS	AL	<i>C. jejuni</i>	CIP-ERI	16,0	16,0
25	1552	2014	RS	AL	<i>C. jejuni</i>	CIP-ERI	16,0	16,0
26	1499	2015	RJ	HU	<i>C. jejuni</i>	CIP-ERI-TT	8,0	16,0
27	1538	2015	RS	AN	<i>C. jejuni</i>	CIP	8,0	16,0
28	1554	2015	RJ	AN	<i>C. coli</i>	CIP-ERI-TT	8,0	16,0
29	1555	2015	RJ	AN	<i>C. jejuni</i>	CIP	8,0	16,0
30	1574	2016	RJ	AN	<i>C. jejuni</i>	CIP	8,0	16,0

Legenda: *controle positivo (CIP), AN-animal, AL-alimento e HU- humano, CIP-ciprofloxacina, ERI-eritromicina e TT- tetraciclina, ATCC- American Type Culture Collection, RJ- Rio de Janeiro, RS-Rio Grande do Sul.

Podemos observar os resultados na Tabela 9, onde das 5 cepas sensíveis a todos os antimicrobianos testados apresentaram MIC=8 µg/mL e das 15 cepas de *Campylobacter* com perfil de resistencia à ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina, 13 apresentaram MIC=8 µg/mL e 2 cepas apresentaram MIC<1 µg/mL Já das 5 cepas com o MIC=16 µg/mL 4 cepas eram resistentes a ciprofloxacina e eritromicina e 1 cepa era resistente a ciprofloxacina e tetraciclina.

Os resultados do MIC da isatina demonstram que a concentração até 8 µg/mL de isatina foi capaz de inibir o crescimento de 83% das cepas de *Campylobacter* testadas, mesmo aquelas apresentando resistência aos antibióticos como a tetraciclina, ciprofloxacina e eritromicina, sendo a eritromicina a última opção para tratamento clínico em casos graves com *Campylobacter*. O restante dos 17% das cepas estudadas que apresentaram MIC=16 µg/mL, de origem humana e de alimentos, mesmo com um MIC um pouco mais elevado, também mostrou um resultado satisfatório quanto ao seu efeito anti-*Campylobacter*.

Na literatura, não foi possível comparar os resultados da MIC da isatina frente ao *Campylobacter* encontrados, por falta de estudos com este Gênero bacteriano. Um estudo somente, de Gao e colaboradores (2019) é que foi observado MICs semelhantes ou maiores, em híbridos de isatina com outros micro-organismos. Os autores desenharam e sintetizaram vários híbridos de amida-1,2,3-triazole isatina com a moxifloxacina, um antibiótico de quarta geração das quinolonas. Todos os híbridos mostraram atividade antibacteriana considerável (MIC: 0,06-128 µg/mL) frente a seis bactérias Gram-positivas testadas, incluindo as cepas resistentes a meticilina de *Staphylococcus epidermidis* (MRSE) e de *Staphylococcus aureus* (MRSA), e as atividades de alguns híbridos foram comparáveis ou mais potentes as da moxifloxacina original (MIC: 0,06-8 µg/mL) e a vancomicina de referência (MIC: 0,5-16 µg/mL) frente a certas cepas. Já para as bactérias Gram-negativas, a maioria dos híbridos exibiu excelentes atividades de *E. coli* ESBLs (-), *E. coli* ESBLs (+), *K. pneumoniae* ESBLs (+), *E. cloacae*, *E. aerogenes*, *Providencia rettigeri* e *Proteus vulgaris* com MIC ≤ 1 µg/mL e atividades moderadas frente a *P. aeruginosa* e *Acinetobacter calcoaceticus* com MIC de 0,5-16 µg/mL. Todos eles foram mais potentes que a vancomicina (MIC > 128 µg/mL), e alguns deles (MIC ≤ 0,03-0,5 µg/mL) frente a todas as cepas Gram-negativas testadas.

A Concentração Mínima Bactericida (MBC) foi determinada a partir dos poços nos quais não houve crescimento bacteriano visível, no teste da MIC anterior à adição do revelador INT. A MBC foi definida como a menor concentração da isatina em estudo capaz de causar a morte do *Campylobacter* (Figuras 26 A, B, C). Os resultados das MBCs mostraram que 73% (22/30) das cepas apresentaram MBC = 16 µg/mL, 20% (6/30) foram MBC=8,0 µg/mL e, 7% (2/30) foram MBC <1,0 µg/mL). Entre as 22 cepas que apresentaram MBC=16 µg/mL, 9 dessas foram isoladas entre 1999 a 2015, tanto no Rio de Janeiro quanto no Rio Grande do Sul, de fontes diversas (animal, alimentos e humana) sendo resistentes a ciprofloxacina, eritromicina e tetraciclina simultaneamente. Outras 4 cepas todas do Rio de Janeiro apresentaram sensibilidade aos antibióticos testados, isoladas em 1980 e 2009. E mais 4 cepas foram resistentes a ciprofloxacina e eritromicina, sendo todas isoladas em 2014 no Rio Grande do Sul. Resistentes somente a ciprofloxacina foram 3 cepas, em 2015 e 2016, sendo 2 do Rio de Janeiro e 1 do Rio Grande do Sul, todas de origem animal. E resistentes a ciprofloxacina e tetraciclina foram 2 cepas de origem alimentar e outra humana em 2008 e 2011, respectivamente (Tabela 9). Os resultados do MBCs demonstraram que a concentração de isatina de 16 µg/mL seria o suficiente para matar 100% das células de *Campylobacter*.

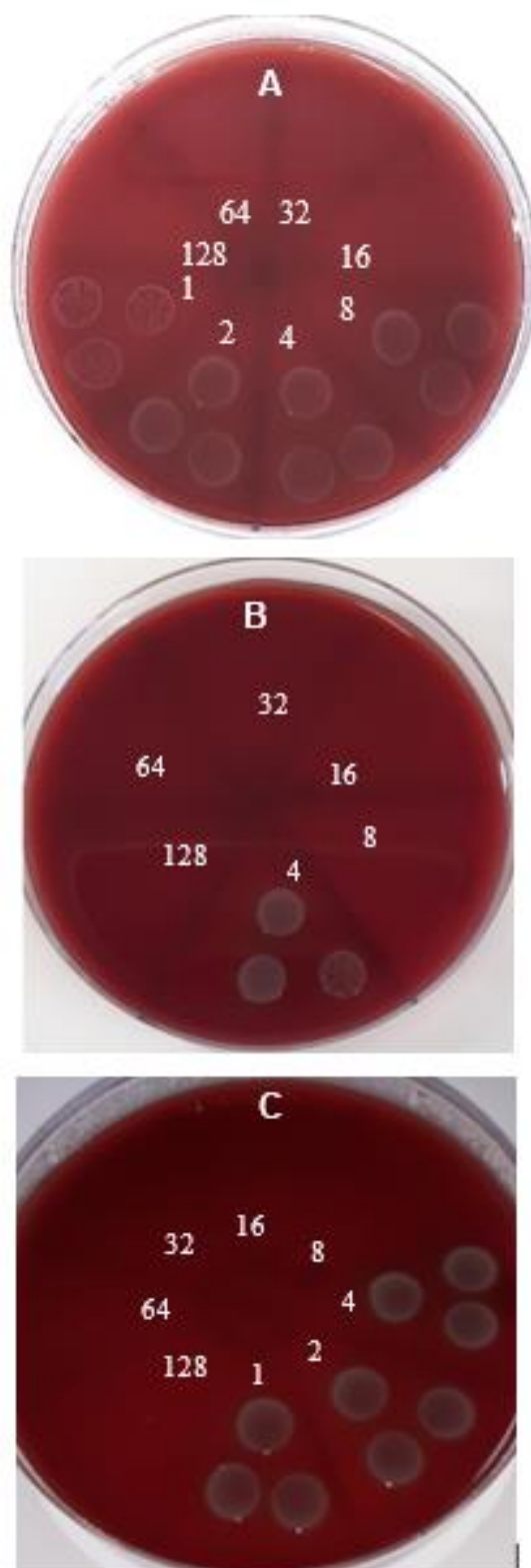


Figura 15. Mostram as placas de Ágar MH acrescidas de sangue com o crescimento bacteriano que foi observado na determinação da MBC. A. (CCAMP1538) apresentou MBC de 16 $\mu\text{g/mL}$; B. (CCAMP 1519) apresentou MBC de 8 $\mu\text{g/mL}$; C. (CCAMP1062) o MBC foi de 8 $\mu\text{g/mL}$.

4.3. Avaliação da Citotoxicidade *in vitro* por Captação de Vermelho Neutro Utilizada para Determinação do IC₅₀ Frente a Linhagem MRC-5

A partir dos resultados promissores, da MIC e do MBC da isatina frente ao *Campylobacter*, prosseguimos o nosso estudo a fim de verificar, o cálculo da concentração inibitória média da isatina (IC₅₀) em células normais da linhagem MRC-5, determinando o nível de sua citotoxicidade.

Os testes de citotoxicidade *in vitro* são utilizados como uma avaliação preliminar para novas substâncias, sendo desenhados para verificar a resposta biológica de células quando expostas a uma dada substância. Um dos métodos utilizados deste para avaliação da citotoxicidade é o teste de captação de vermelho neutro (NRU), o qual se baseia na habilidade de células viáveis em incorporar e se ligar ao vermelho neutro (NR), um corante supravital (ATES et al., 2017).

A alteração da superfície celular ou da membrana lisossomal por um agente pode causar fragilidade lisossomal e outras alterações que gradualmente se tornam irreversíveis. O teste de NRU torna possível distinguir entre células viáveis, de células danificadas ou mortas porque essas alterações resultam em menor absorção e ligação de NR mensurável por leituras da densidade ótica, possibilitando o cálculo da IC₅₀.

A IC₅₀ (concentração inibitória 50%) se refere a concentração substância em teste, que produz 50% de inibição do parâmetro medido, ou seja, viabilidade celular. É recomendado que as concentrações de cada substância testada devem abranger a faixa de nenhum efeito até a inibição total da viabilidade celular (OECD, 2010).

Neste estudo, para avaliar a citotoxicidade, foram realizados três experimentos independentes, em cada um foram avaliadas 8 concentrações da isatina em 6 replicatas. O mesmo foi aplicado para o controle positivo (CP). Nos três experimentos realizados, as DOs dos brancos se apresentaram aproximadamente igual a 0,05 e as DOs dos controles negativos > 0,3, dentro do recomendado por ICCVAM, 2006. A Figura 27, mostra a avaliação da morfologia celular, e pode-se observar que o controle de células se manteve íntegro ao final do período de observação (Figuras 27 A e B). Houve uma diminuição acentuada da densidade celular e alteração na morfologia celular nas concentrações de isatina 1024 µg/mL (Figuras 27 C e D) e 512 µg/mL, a partir da concentração 256 µg/mL (Figuras 27 E e F) notou-se um aumento gradativo da densidade celular e normalização da morfologia celular, onde na concentração 8 µg/mL (Figuras 27 G e H) não se notou diferença para o controle de células.

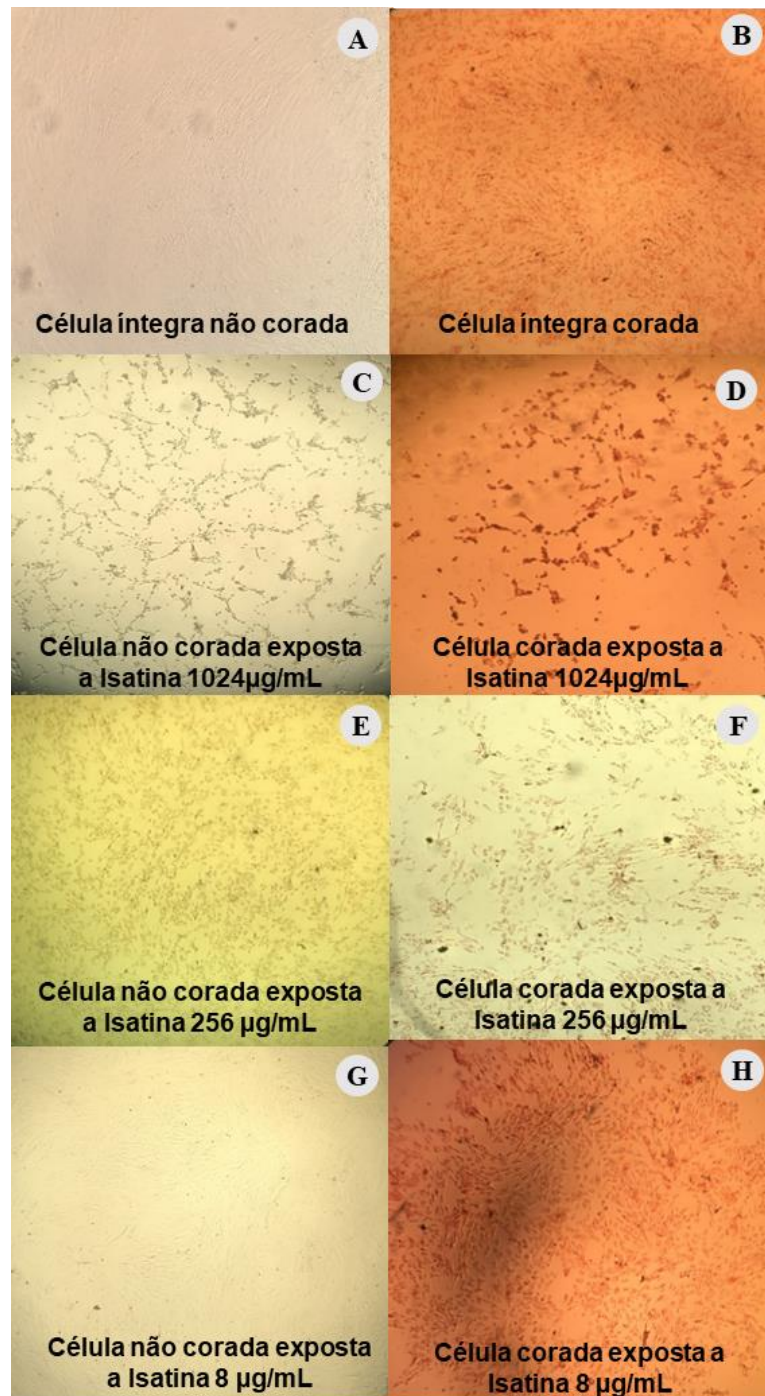


Figura 16. Morfologia celular após exposição de 48 horas. A. Controle de células íntegro e sem coloração; B. Corado com vermelho neutro; Isatina 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$; C. Sem coloração; D. Corado com vermelho neutro; Isatina 256 $\mu\text{g}/\text{mL}$; E. Sem coloração; F. Corado com vermelho neutro; Isatina 8 $\mu\text{g}/\text{mL}$; G. Sem coloração; H. Corado com vermelho neutro. Aumento 40X.

As células MRC-5, são de uma linhagem celular diploide humana, derivada de tecido de pulmão normal, de um feto de menino de 14 semanas. Estas células foram depositadas por J.P. Jacobs em setembro de 1996 (JACOBS, 1970). A MRC-5 apresenta morfologia característica de fibroblasto (Figuras 27 A e B).

Observando e avaliando as células expostas às diferentes concentrações da isatina, ficou bastante evidente o aumento da citotoxicidade nas concentrações mais altas, isto é 1024, 512 e 256 µg/mL, e a partir da concentração 128 µg/mL notou-se uma diminuição da citotoxicidade, onde foi observado uma morfologia celular característica e aumento da densidade de células, o que pode ser confirmado com a viabilidade crescente frente às concentrações decrescentes. Ou seja, quanto maior a concentração da isatina a que as células foram expostas, menor a densidade celular, conseqüentemente menor a viabilidade celular também. Isso foi refletido em uma menor captação do corante vermelho neutro, uma vez que o mesmo só é captado por células viáveis.

O controle positivo (CP) foi usado nos testes de citotoxicidade como forma de validar o ensaio. Neste estudo o CP foi avaliado no tempo de exposição de 48 horas, conforme recomendado do guia 129 da OECD (OECD, 2010).

A Figura 28 mostra a curva de dose-resposta ajustada para o CP, a qual apresentou um R2 (coeficiente de determinação) de 0,99, dentro do recomendado de $\geq 0,85$ para o ajuste do modelo Hill.

Os valores de viabilidade para o CP variaram de 3,33 a 97,55% e o valor encontrado de IC₅₀ para o CP foi 15,6 µg/mL. Segundo ICCVAM, 2006 os valores de IC₅₀ para o controle positivo, devem ser $41,5 \pm 4,8$ µg/mL (n = 233) para o ensaio NRU em células 3T3 e $3,11 \pm 0,72$ µg/mL (n = 114) em células NHK.

Para a célula MRC-5, utilizada nesse estudo, ainda não existe valor de IC₅₀ calculado na literatura. O resultado encontrado de 15,6 µg/mL é um valor aceitável tendo em vista abranger a faixa de nenhum efeito (97,55%) a inibição total da viabilidade celular (3,33 %) e um R2 de 0,99.

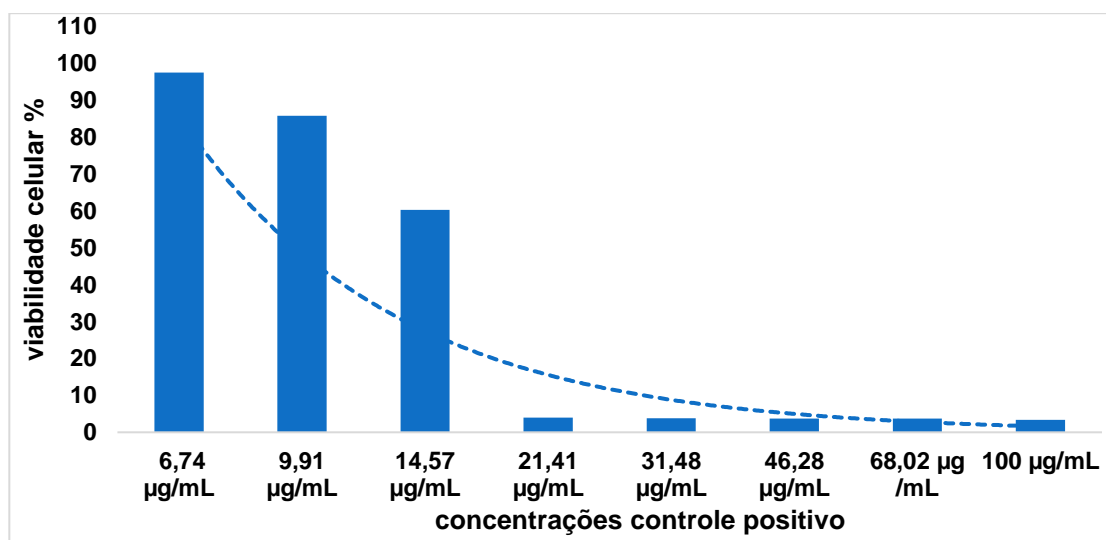


Figura 17. Viabilidade celular do controle positivo frente a linhagem celular MRC-5, onde: IC₅₀ = concentração inibitória 50%; R2= fator de determinação; CI= intervalo de confiança de 95%.

Os valores de viabilidade celular para a isatina variaram de 2,28 a 120,64% no tempo de exposição de 24 horas; 4,71 a 112,96% para 48 horas e 6,12 a 88,33% para 72 horas, abrangendo a faixa de nenhum efeito a inibição total da viabilidade celular, conforme mostra o Gráfico 1, onde pode ser observado a linha traçada para o tempo de 48 horas, uma tendência linear, ou seja, à medida que a concentração da isatina diminuiu houve um aumento da viabilidade celular, o que mostra que a quantidade de corante

incorporado às células é diretamente proporcional ao número de células com membrana intacta. O Gráfico 2 (Figura 29) mostra os valores de IC₅₀ obtidos para a isatina e a Tabela 10 os resultados numéricos para os valores de IC₅₀.

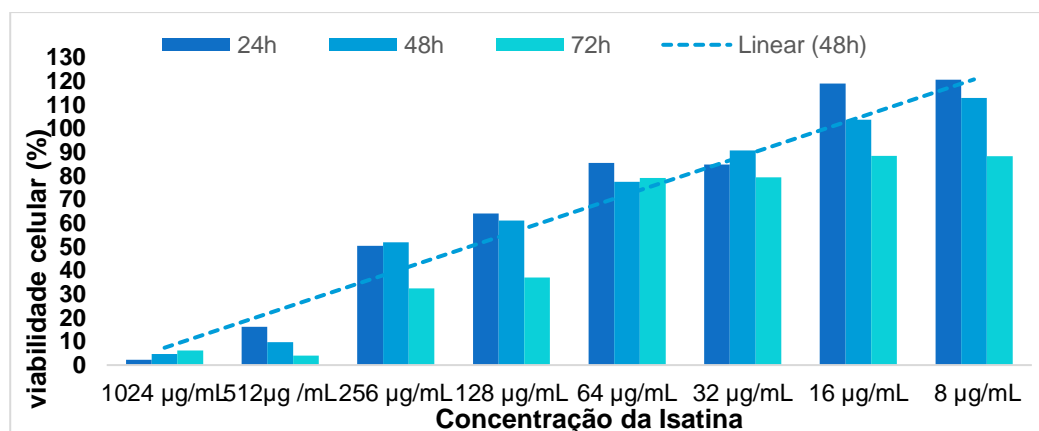


Figura 18. Viabilidade celular da isatina frente linhagem celular MRC-5.

Tabela 9. Valores de IC₅₀ (µg/mL) para isatina frente a linhagem celular MRC-5

IC ₅₀ (µg/mL)			
Experimento	24 h	48 h	72 h
1	200,7	167,3	181,5
2	95,56	109,65	130,84
3	123,50	108,10	167,40
Média geométrica	133,30	125,63	158,41
Desvio Padrão	54,46	33,74	26,15
%Coeficiente de Variação	40,85	26,86	16,51

Os valores de IC₅₀ para isatina foram calculados e aplicado o Método de Grubbs para verificação da existência de valores discrepantes, e nenhum resultado de IC₅₀ foi considerado um *outlier*. O teste de ANOVA foi realizado e o valor de P foi 0,8925, o que demonstra não haver diferença significativa entre as médias, e também, demonstra homogeneidade dos dados.

A Tabela 10 mostra os valores de IC₅₀ para cada experimento realizado, em cada tempo de exposição. Para o tempo de exposição de 48 horas, padronizado no guia 129 da OECD (OECD 2010), o valor de IC₅₀ encontrado para a isatina foi de 125,63 µg/mL. Correlacionado com o maior valor de MIC encontrado, 16 µg/mL, esses dados sugerem que a isatina pode ser considerada uma substância segura no que diz respeito ao parâmetro citotoxicidade.

No estudo de validação da citotoxicidade basal *in vitro*, os resultados IC₅₀ para as substâncias teste variaram de 0,005 a 38.878 µg/mL nas células 3T3 e 0,00005 a 49.800 µg/mL nas células NHK (ICCVAM, 2006).

Visando a melhor visualização a distribuição dos valores calculados de IC₅₀, o Gráfico 3 (Figura 30) mostra os valores de IC₅₀ para cada tempo de exposição avaliado. Neste estudo, os valores de IC₅₀ variaram de 96,56 a 200,7 µg/mL para o tempo de exposição de 24 horas; de 108,10 a 167,3 µg/mL para 48 horas e 130,84 a 181,5 µg/mL para 72 horas. Podemos observar

que não houve uma diferença significativa entre os tempos de exposição avaliados, o que pode ser comprovado pela aplicação do ANOVA.

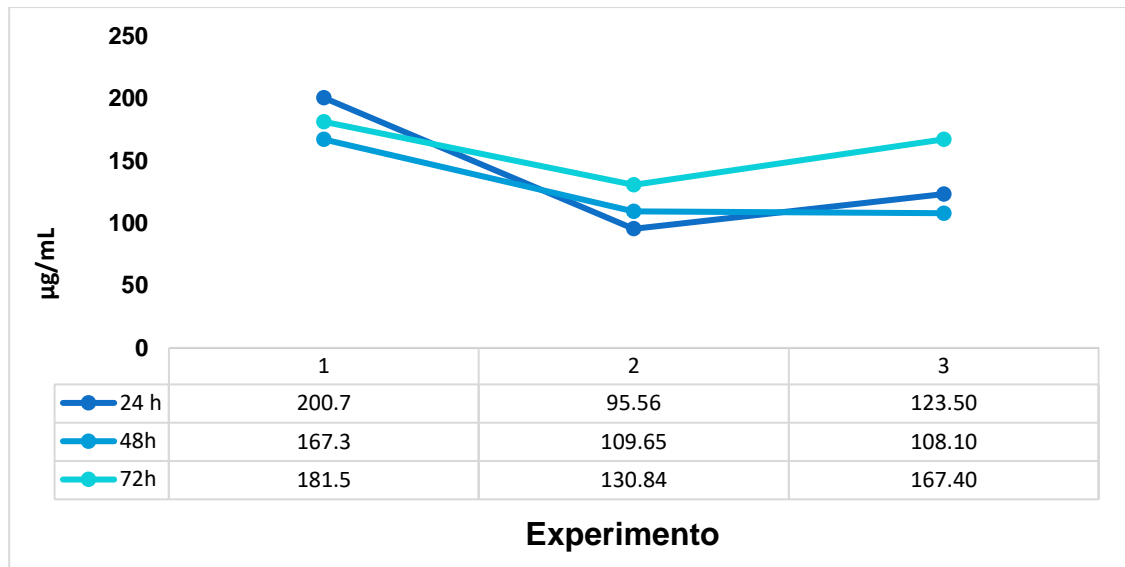


Figura 19. Distribuição dos valores de IC_{50} para os experimentos com a isatina frente a linhagem celular MRC-5.

4 CONCLUSÕES

Neste trabalho de Tese foi observado o potencial da atividade antimicrobiana da isatina em relação as espécies de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli*, onde concentrações na faixa < 1 µg/mL até 16 µg/mL desta substância foram capazes de agir frente as bactérias deste gênero. Esse potencial anti-*Campylobacter* foi confirmado na determinação dos valores de MIC e MBC.

Na avaliação do efeito da isatina frente a linhagem MCR-5 de células normais o parâmetro citotoxicidade mostrou que esta substância tem potencial para ser utilizada na clínica médica, após mais estudos.

O mecanismo de ação da isatina na célula bacteriana, em *Campylobacter* ainda precisam ser esclarecidos, em estudos futuros.

Os resultados encontrados apontam para a necessidade de aprofundar as pesquisas não só com a isatina, como também com os seus derivados a fim de estabelecer seu potencial uso, como uma possível alternativa de agente antibacteriano no controle de infecções bacterianas, especialmente as que envolvem espécies do gênero *Campylobacter* multi-resistentes.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo realizado na tese de doutorado referente ao efeito de atividade antimicrobiana de extratos, frações, óleos essenciais e substâncias isoladas de espécies vegetais e substâncias sintéticas frente ao *Campylobacter* demonstraram resultados promissores. O trabalho acadêmico pode contribuir com novos estudos que avaliem os derivados da isatina e, também, estudar o mecanismo de ação bactericida da isatina frente a outras espécies de *Campylobacter*. Assim como, avaliar em células hepáticas normais a citotoxicidade pela metodologia de IC50. Os estudos à serem realizados contribuirão para o controle de infecções bacterianas e da redução dos efeitos colaterais apresentações pelos antibióticos de uso clínico.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABPA - **Associação Brasileira de Proteína. Relatório Anual 2019**. São Paulo: [s. n.], 2019. Disponível em: <<https://abpa-br.org/wp-content/uploads/2019/08/Relat%C3%B3rio-Anual-2019.pdf>>. Acesso em: 25 abr. 2021.

ADWAN, G.; ABDU-SHANAB, B.; ADWAN. K. Antibacterial activities of some plant extracts alone and in combination with different antimicrobial against Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* strains. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v.3, n.4, 2010, p.266-269. [https://doi.org/10.1016/S1995-7645\(10\)60064-8](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(10)60064-8). Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1995764510600648>. Acesso em 10 oct. 22.

AGÊNCIA DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Ministério da Saúde. **Resistência antimicrobiana é ameaça global, diz OMS**. Brasília, DF: ANVISA, 2019. Disponível em: <<https://www.gov.br/anvisa/pt-br/assuntos/noticias-anvisa/2019/resistencia-antimicrobiana-e-ameaca-global-diz-oms>>. Acesso em: 23 de set. 2021.

AGROSABER. **Brasil abre mercado e amplia pauta de exportações de produtos agropecuários para oito países em março**. Plataforma Agrosaber. Disponível em: <<https://agrosaber.com.br/brasil>>. Acesso em: 24 abr. 2021.

ATES, G., VANHAECKE, T; ROGIERS, V., RODRIGUES & ROBIM M. Cell viability assay using the neutral red Uptake assay. In: Gilbert, D., Friedrich, O. (eds) **Cell Viability assay. Method in Molecular Biology**, v. 1601, 2017. Humana Press, Nova York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-6960-9_2. Disponível em: <https://link.springer/protocol/10.1007/978-1-4939-6960_2>. Acesso em: 25 nov. 22

BERALDO, H. Semicarbazones e tiosemicarbazones: their wide pharmacological profile and clinical applications. **Química Nova**, v.27, p.461-571, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000300017>. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/qn/a/a/dQXNGvqTcfRJjbn88VzV9J?lang=pt&format=html>. Acesso em: 28 out. 22.

BOLINGER, H.K.; ZHANG, Q.; MILER, W.G.; KATHARIOU, S. Lack of evidence for erm (B) infiltration into erythromycin-resistant *Campylobacter coli* and *Campylobacter jejuni* from comercial Turkey production in Eastern North Carolina: a major Turkey-growing region in the United States. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 15, p. 1-3, 2018. Disponível em: <<https://www.researchgate.net/publication/326961601>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

BOVILL, R.A., MACKEY, B.M. Resuscitation of ‘non-culturable’ cells from aged cultures of *Campylobacter jejuni*. **Microbiology**, v.143, n. 5, p. 1575-1581, 1997. Disponível em: <<https://www.microbiologyresearch.org/content/journal/micro/10.1099/00221287-143-5-1575>>. Acesso em: 27 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA). **Secretaria de defesa agropecuária (2020)**. Disponível em: https://dspace.mj.gov/bitstream/1/239/1/DEC_2020_10208.pdf. Acesso em: 24 oct. 2022.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e abastecimento (MAPA). **Alimentos para animais**. DOC SAC/CGAL n° 04 - Escopo da área de microbiologia - Reações - ver. 12, publicado em 10/01/2018 – atualizado em 03/07/2018. Brasília, DF: MAPA, 2018. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/laboratorios/credenciamento-e-laboratorios-credenciados/legislacao-metodos-credenciados/alimentos-para-animais>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

BRASIL. Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA). **Resistência a antimicrobianos**. Instrução Normativa n. 41, de 23 de outubro de 2017. Disponível em: <<https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/insumos-agropecuários/insumos-pecuários/resistência-aos-antimicrobianos/legislação/INSTRUONORMATIVA41DE23DEOCTUBRODE2017.pdf>>. Acesso em 23 oct. 2022.

BRASIL. Ministério da Saúde (MS). **Fitoterapia no SUS**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2012. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 17 nov. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Política nacional de práticas integrativas e complementares no SUS: PNPIC-SUS**. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2006. Disponível em: <<https://bvms.saude.gov.br/bsv/publicacoes/pnopic.pdf>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual técnico de diagnóstico laboratorial de *Campylobacter***: gênero *Campylobacter*: diagnóstico laboratorial clássico e molecular. Secretaria de Vigilância em Saúde, Fundação Oswaldo Cruz, Laboratório de Referência Nacional de Enteroinfecções Bacterianas (Série A. Normas e Manuais Técnicos), Instituto Adolfo Lutz. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2011. 40 p. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2015/janeiro/09/manual-tecnico-diagnostico-laboratorial-campylobacter.pdf>>. Acesso em: 30 nov. 2021.

BRENES, A.; ROURA. Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. **Animal Feed Science and Technology**, v.158, p.1-4, edições: 1-2 (2010). Doi: <https://doi.org/10.1016/j.anifeedsci.2020.03.007>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S03778400110000775?via%3Dihub>>. Acesso em: 31 out. 2022.

BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in food – A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 1;94, n. 3, p. 223-253. Doi: <<https://10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022>>. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/15246235/>>. Acesso em: 30 out. 22.

BUTZLER, J.P. *Campylobacter* from obscurity to celebrity. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 10, n. 10, p. 868-76, oct. 2004. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15373879/>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

BYAMBAJAV, Z.; BULGAN. E.; HIRAI Y.; NAKAYAMA, M.; TANAKA, M.; NITTA, Y.; SUZUKI, A.; UMEMURA, T.; ALTANKHUU, B.; TSAGAAN, A.; VANAABAATAR, B.; JANCHIVDORJ, E.; PUREVDORJ, NO.; AYUSHJAV, N.; YAMASAKI, T.; HORIUCHI, M. Research note: Antimicrobial resistance of *Campylobacter* species isolated from chickens near Ulaanbaatar city, Mongolia. **Poultry Science**, v. 100, n. 3, mar 2021. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/PMC7936202/>>. Doi: 10.1016/j.psj.2020.11.079. Epud 2021 Dec. 11. PMID: 33518344; PMCID: PMC7936208. Acesso em: 03 ago. 2022.

CALIXTO J.B. Twenty-five years of rearch on medicinal plants in latin America: A personal view. **Journal Ethnopharmacology**. 2005 aug. V. 22; 100, n. 1-2, p. 131-4. Doi: 10.1016/j.jep.2005.06.004. PMID: 16006081. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16006081/>>. Acesso em 06 oct. 2022

CANDIDO-BACANI, P.D.; REIS, B.D.; SERPOLONI, J.M.; CALVO, T.R.; VARANDA, E.A.; COLUS, I.M.D. Mutagenicity and genotoxicity of isatin in mammalian cells in vivo. **Mutation Research**, v. 719, p. 47-51, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.mrgentox.2010.11.006>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S128367181000389X>. Acesso em 10 oct. 2022

CARVALHO, C. A. **Avaliação do potencial antifúngico, antioxidante e citotóxico dos extratos de Jacaranda decurrens Cham. (Carobinha)**. 2007. 79f. 2007. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade de Ribeirão Preto, São Paulo. Disponível em: https://www.dominiopublico.gov.br/Pesquisa/DetalheObraForm.do?select_action=&co_obra=92766. Acesso em: 06 oct. 2022.

CARVALHO, A.C.B., BRANCO, P.F.; FERNANDES, L.A.; MARQUES, R.F. de O.; CUNHA, SIMONE, C.; PERFEITO, J.P.S.; Brazilian regulation on medicinal plants and herbal medicines, v.7, n. 01 (2012). Doi: <https://doi.org/10.32712/2446-4775.2012.132>. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/132/1178>>. Acesso em: 01 nov. 2022.

CDC - Center for Disease and Control Prevention. **Campylobacter. Octbreak of multidrug resistant CAMPYLOBACTER infections linked infections to contact whit pet store puppies**. U.S. Department of Health & Human Services, 2021. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/campylobacter/faq.html>>. Acesso em: 15 jun. 2021.

CDC-Centers for Disease Control and Prevention. **Campylobacter (Campylobacteriosis)**. U.S. Department of Health & Human Services, 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/campylobacter/faq.html>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

CHAKRABORTY, K.; LIPTON, A.P.; PAULRAJ. R.; CHAKRABORTY, R.D. Guaiane sesquiterpenes from seaweed *Ulva fasciata Delile* and their antibacterial properties. **European Journal of Medical Chemistry**, v. 45, n. 6, p. 2237-2244, jun. 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20163893/>>. Acesso em: 27 nov. 2021.

CLSI a. Clinical and Laboratory Standards Institute. M7-A6 - **Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactéria de crescimento aeróbico**: norma aprovada. 6. ed. Wayne, Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003. Disponível em: <https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_opasm7_a6.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2021.

CLSI b. Clinical and Laboratory Standards Institute. M2-A12 - **Performer standard for antimicrobial disk susceptibility tests**: approved standard. 13. ed. CLSI standard M02-A12. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2018. Disponível em:

<https://www.anvisa.gov.br/servicosaude/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>. Acesso em: 27 de nov. 2021.

COUNCIL OF THE EUROPEAN UNION. Council regulation on the authorization of the additive avilamycin in feedingstuffs. 2003. Disponível em: <http://register.consilium.eu.int/pdf/en/03/st06120en03.pdf>.

DAVIES, J.; DAVIES, D. Origins and evolution of antibiotic resistance. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 74, n. 3, p. 417-433, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2937522/>>. Acesso em 23 nov. 2021

DIAZ-SANCHEZ, S.; D´SOUZA, D.; BISWAS, D. and HANING, I. Botanical alternatives to antibiotics for use in organic poultry production. **Poultry Science**, v. 94, n. 6, p. 1419-1430. Doi: 10.3382/ps/pev014. Epub 2015. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/273140148_Botanical_alternatives_to_antibiotics_for_use_in_organic_poultry_production. Acesso em: 30 out. 22.

DOYLEY, L.P.A. Vibrio associated with swine dysentery. **American Journal of Veterinary Research**, Chicago, n. 5, p. 3-5, 1944. Disponível em: <<https://www.conhecer.org.br/enciclop/2014a/AGRARIAS/campylobacter.pdf>>. Acesso em 24 nov. 2022

EFSA - European food Safety Authority. Manual para relatar a resistência antimicrobiana no âmbito da Diretiva 2003/99/CE e da Decisão 2013/652/EU para informações decorrentes do ano de 2016. **European Food Safety Authority Journal**, 2017. Disponível em: <<https://www.efsa.europa.eu/en/supporting/pub/en-1176>>. 2016. Acesso em: 28 jul. 2021.

EFSA - European food Safety Authority. The European Union summary report on trends and sources of zoonoses, zoonotic agents and food-borne outbreaks in 2017. **European food Safety Authority Journal**, v. 16, n. 12, dec. 2018. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/efsajournal/pub/5500>>. 2021. Acesso em: 21 nov. 2021.

EFSA – European food Safety Authority. Monitoring AMR in *Campylobacter jejuni* from Italy in the last (2011 – 2021): Microbiological and WGS data risk assessment. **EJEFSAJournal on the Willy online Library**. Disponível em: <https://www.efsa.europa.eu/em/efsa/pub/e200406>. Acessado em: 22 de Jul. 2022.

ELOFF, J.N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, n. 8, p. 711-713, dec. 1998. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9933989/>>. Acesso em: 27 nov. 2021.

ESCHERICH, T. **Die darmbakterien des säuglings und ihred beziehungen zur physiologie der** (Infant intestinal bacteria and their relationship do digestive). Publisher by Ferdinand Enke, Stuttgart, 1886. Disponível em: <<https://wellcomecollection.org/works/kmx9gg9h>>. Acesso em: 21 nov. 2021.

EUZÉBY, J.P. List of Prokaryotic names withstanding in nomenclature – Genus *Campylobacter*, 2022. Disponível em: <<https://ipn.dsmz.de/Search/?word=Campylobacter>>. Acessado em: 23 oct. 2022

FÀBREGA, A.; SÁNCHEZ-CÉSPEDES, J.; SOTO, S.; VILA, J. Quinolone resistance in the food chain. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 31, n. 4, p. 307-315, apr. 2008. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924857908000174>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

FAIVRE, S.; DEMETRI, G.; SARGENTE, W.; RAYMOND, E. Molecular basis for sunitinib efficacy and future clinical development. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 6, p. 734-745, 2007. Doi <http://doi.org/10.1038/nrd2380>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrd2380>. Acesso em: 12 oct. 2022.

FDA. (U.S. Food and Drug Administration). Department of Health and Human Services. **2014 Summary report on antimicrobials sold or distributed for the use in food – Producing Animals**. Center for veterinary medicine protecting and animal – FDA, 2015. Disponível em: <<https://www.fda.gov/media/94906/download>>. Acesso em: 3 oct. 2021.

FDA. Bad Bug Book, Foodborne pathogenic microorganisms and natural toxins. Second edition. *Campylobacter jejuni*. **Food Drug Administration**, p. 14-17, 2012. Disponível em: <https://www.usf.edu/resarch-innovation/resarch-integrity-compliance/documents/iacuc/zoonotics/bad-bug-book-pdf>. Acesso em: 06 oct. 2021

FISHER, K. and PHILLIPS, C. The mechanism of action of a citrus oil blend against *Enterococcus faecium* and *Enterococcus faecalis*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 106, n. 4, p. 1343-1349. Doi: <https://10.1111/j.1365-2672.2008.04102.x>. Epub 2009. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/19187138/>. Acesso em 31 out. 22.

FRASÃO, B.S.; CÔRTEZ, L.R.; NASCIMENTO, E.R. Detection of fluoroquinolone resistance in *Campylobacter* strains from organic poultry. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, n. 7, p. 613-619, jul. 2015. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/pvb/a/5Z755Cjw4vhMPBNZ7XkYd/abstract/?lang=en>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

FRODER, H.; RUIS, M.; DEBRES, T. Regulamentação de *Campylobacter* para exportação de frango que altera o regulamento (CE) nº 2073/2005 no que diz respeito à *Campylobacter* em carcaças de frangos de carne. **UNIANALISES**. 2021. Disponível em: <<http://www.univates.br/univates.br/unianalises/noticias/noticia-1>>. Acesso em: 30 jun. 2021.

GADISA E, USMAN H. Evaluation of the antibacterial activity of essential oils and their combination against multidrug resistant bacteria isolated from skin ulcers. **International Journal Microbiology**. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.gov/pmc/articles/PMC8019328>. 26 de março de 2021: 6680668.doi: 10.1155/2021/6680668. PMID:33854550; PMCID: PMC8019382.

GARG, H.S.; SHARMA, M.; BHAKUNI, S.D.; PRAMANIK, B.N.; BOSE, A.K. An antiviral sphingosine derivate from the green alga *Ulva fasciata*. **Tetrahedron Letters**, v. 33, n. 12, p. 1641-1644, mar. 1992. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0040403900916952?via%2Fihub>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

GAO, F.; YE, L.; KONG, F.; HUANG, G.; XIAO, J. Design, synthesis and antibacterial activity evaluation of moxifloxacinamide-1,2,3-triazole-isatin hybrids. **Bioorganic Chemistry**, v. 91, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bioorg.2019.103162>. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0045206819309654?casa_token=93ZuGnBljK8AAAAA:EdM5GyalMCxdTE53uwoQAQE78kdp8l3Av4OKAA7oFfwXbCnPXnO6uC8z6nGx1FQ2xfu1P9n22jY>. Acesso em: 30 out. 2022

GUINOISEAU, E.; LUCIANI, A.; ROSSI, P.G.; QUILICHINI, Y.; TERNENGO, S.; BRADESI, P.; BERTI, L. Cellular effects induced by inula graveolens and *Santolina corsica* essential oils on *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v. 29, n. 7, p. 873-879. Doi: 10.1007/s10096-010-0943-x. Epub 2010. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20490884/>. Acesso em: 31 out. 2022.

GUO, H. Isatin derivatives and their anti-bacterial Activities. **European Journal Chemistry**, v. 15, n. 164, p. 164-678-688, feb. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30654239/>>. Acesso em: 27 nov. 2021.

HALL, M.D.; BRIMACOMBE, K.R.; VARONKA, M.S.; PLUCHINO, K.M.; MONDA, J. K.; LI, J.; WALSH, M.J.; BOXER, M.B.; WARREN, T. H.; FALES, H.M.; GOTTESMAN, M.M. Synthesis and structure-activity evaluation of isatin- β -thiosemicarbazones with Improved selective activity toward multidrug-resistant cells expressing p-glycoprotein. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 54, p. 5878-5889, aug. 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3201829/>>. Acesso em: 27 nov. 2021.

HAVELAAR, A.H.; PELT, V.W., JAAP, A.W.C.; PUTTEN, V.P.M.W., GROSS&NEWLL, G.D. (2009) Immunity to *Campylobacter*: its role in risk assessment and epidemiology. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 35, n. 1, p. 1-22, 2009. DOI: 10.1080/1040841080263617. Disponível em: <<https://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/10408410802636017>>. Acesso em: 23 oct. 2022

HUMPHREY, T.S.; O'BRIEN, M.M. *Campylobacters* as zoonotic Pathogens: a food production perspective. **International Journal Food Microbiology**, v. 117, n. 3, p. 237-257, jul. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17368847>>. Acesso em: 27 de nov. 2021.

HUNGARO, M.H.; MENDONÇA, S.C.R.; ROSA, O.V.; BADARÓ, L.C.A.; MOREIRA, S.A.M.; CHAVES, P.B.J. Low contamination of *Campylobacter* spp. On chicken carcasses in Minas Gerais state, Brazil: Molecular Characterization and antimicrobial resistance. **Food Control**, v. 51, p. 15-22, may. 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0956713514006355>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

HUSSEIN, K.; RAZ-PASTEUR, A.; SCHACHOR-MEYOUHAS, Y.; GEFFEN, Y.; OREN, I.; KASSIS, I. *Campylobacter* bacteraemia: 16 years of experience in a single centre. **Doenças Infecciosas**, v. 46, n. 11-12, p.796-799, nov./ dec. 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27320494/>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

ICCVAM – Background review document: In vitro basal cytotoxicity test methods for estimating acute oral systemic toxicity. Research Triangle Park, NC: National Institute for Environmental Health Sciences. 2006. Disponível em:

http://ntpniephs.nih.gov/iccvam/docs/acutetox_docs/brd_tmer/at-tmer-complete.pdf. Acesso em: 12 set. 22

INGOK, A. & GULER, F. Cardamom, cumim, and Dil weed essencial oils: Chemical composition, antimicrobial activities, and mechanisms of Against *Campylobacter* spp. **Molecules**, v. 22, n. 7, 2017. Doi: <https://doi.org/10.3390/molecules22071191>. Disponível em: <https://www.mdpi.co/1420-3049/22/7/1191>. Acesso em: 28 out. 22.

JACOBS, J.; JONES, C.M.; BAILLE, J. Characteristics of a human diploid Cell designated MRC-5. **Nature**, v. 227, p. 168-170, 1970. <https://doi.org/10.1038/227168a0>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/2271168a0>. Acesso em: 12 set. 2022.

JAIN, D.; SINHA, S.; PRASAD, K.N.; PANDEY, C.M. *Campylobacter* species and drug resistance in a North Indian rural community. **Transactions of the Royal of tropical Medicine and Hygiene**, v. 99, n. 3, p. 207-214, mar. 2005. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15653123/>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

JANG, K.L.; KIM, M.G., HA, S.D.; KIM, K.S.; LEE, K.H.; CHUNG, D.C.H.; KIM, C.H.; KIM, K.Y. Morphology and adhesion of *Campylobacter jejuni* to chicken skin under varying conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 17, n. 2, p. 202-206, feb. 2007. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18051750/>>. Acesso em: 27 nov. 2021.

JONES, F.; ORCUTT, M.; LITTLE, R.B. Vibrios (*Vibrio jejuni*, n. sp) associated with intestinal disorders of cows and calves. **The Journal of Experimental Medicine**, New York, n. 53, p. 853-854, 1931. Acesso em: 27 nov. 2021.

JOSHI T, PANDEY SC, MAITI P, TRIPATHI M, PALIWAL A, NAND M, SHARMA P, SAMANT M, PANDE V, CHANDRA S. Antimicrobial activity of methanolic extracts of *Vernonia cinérea* against *Xanthomonas oryzae* and identification of compounds using sílica techniques. **PLoS One**, v. 14, n. 6, 2021. Disponível em: 29 <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34125862/>. PMID: 34125862; PMCID: PMC820298. Acesso em: 29 Jul 2022.

KIST, M. The historical background of *Campylobacter* infection: new aspects. In: PEARSON, A.D. **Proceedings of the 3rd International Workshop on Campylobacter Infections**. London: Public Health Laboratory Service, p. 23-27, 1985. Disponível em: < www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2627687/>. Acesso em: 27 nov. 2021.

KUMAR, C.G.; MONGOLLA, P.; JOSEPH, J.; NAGESWAR, Y.V.D., & KAMAL. A. (2010). Antimicrobial activity from the extracts of fungal isolates of soil and dang samples from kaziranga National Park, Assam, India. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 20, n. 4, p. 283-289. <https://doi.org/10.1016/j.mycmed.2010.08.002>. Disponível em: www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1156523310001010. Acesso em: 10 oct. 2022.

LELIS, C.A.; DE CARVALHO APA.; CONTE J.R.C.A. a Systemic Review on nanoencapsulation natural antimicrobials in foods: In vitro versus in situ evaluation, mechanisms of action and implications on physical-chemical quality. **Revista Internacional de Ciências Moleculares**, v. 22, n. 21, nov. 2021. Disponível em: <http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34769485/>. Doi: 103390/ijms22212055. PMID: 34769485; PMCID: PMC8584738. Acesso em: 29 Ag. 2021.

LIMA M.R.F.; LUNA, JS.; SANTOS, A.F.; ANDRADE, M.C.C.; SANTANA, A.E.G.; GENET, J.; MARQUEZ, B.; NEUVILLE, L, MOREAU, N. Antibacterial activity of some Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 21; 105, n. 1-2, p. 137-147, apr. 2006. Doi: 10.1016/j.jep.2005.10.026. Epud 2005 Dec 13. PIMID: 16356672. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16356672/>. Acesso em: 08 oct. 2022.

LIU, B.; POP, M. *ARDB - Antibiotic Resistance Genes Database*. **Nucleic Acids Research**, v. 37, p. D443-D447, jan. 2009. Disponível em: https://academic.oup.com/nar/article/37/suppl_1/D443/1002454>. Acesso em: 22 nov. 2021.

KHAN, A. MAALIK, A; NOOR, T.; ZAIDI, A.; FAROOQ, U; BUKHARI, S.M. Advances in Pharmaceutical of Isatin and its Derivatives: A Review. *Tropical journal of Pharmaceutical Research*, v. 14, n. 10, p. 1937-1942, 2015. Disponível em: https://www.tjpr.org/admin/1239000798187_14_28.pdf. Acesso em: 02 mar.2023

MATHUR G.; NAIN S. Recent advancement in Synthesis of isatin as anticonvulsant agents: A review. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 4, n. 4, p. 417-427, 2004. Doi: 0.4172/2161-0444.1000173. Disponível em: <https://www.hilarispublisher.com/opemaccess/recent-advancement-in-synthesis-of-isatin-as-anticonvulsant-agents-a-review-2161-0444.100417.pdf>. Acesso em: 13 oct. 2022.

MAYORGA O.A.S.; DA COSTA Y.F.G.; DA SILVA J.B.; SCIO E.; FERREIRA A.L.P.; DE SOUZA O.V.; ALVES M.S. *Kalanchoe brasilienses* Cambess, a promising natural source of antioxidant and antibiotic agents against multidrug-Resistant pathogens for the treatment of *Salmonella* gastroenteritis. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1-15, 2019. <https://doi.org/10.1155/2019/9245951>>. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/omcl/2019/9245951/>>. Acesso em 24 oct. 2022.

MCFAYDEAN, S.S.; STOCKMAN, S. **Report of the Departmental Committee appointed by the board of agriculture and fisheries to inquire into epizootic abortion**. Appendix to part III, Abortion in sheep. London. England: Printed under the authority of H.M.S.O. by Eyre and Spottiswoode, 1913. 33p.

MEDEIROS, Valéria de Mello. **Isolamento e identificação fenotípica das espécies termofílicas de *Campylobacter* a partir de frango resfriado**. Dissertação (Mestrado Profissional) - Programa de pós-Graduação em vigilância Sanitária INCQS/FIOCRUZ, Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/10835/1/54.pdf>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

MEDEIROS, V.M; BRICIO, S.M.L; CLEMENTINO, M.B.M. Identificação de *Campylobacter jejuni* e *Campylobacter coli* isoladas de carcaças de Frango pela multiplex PCR. **Vigilância Sanitária em Debate: Sociedade, Ciência & Tecnologia**, v. 3, p. 97-103, 2015. Disponível em: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57061423015>. Doi: 10.3395/2317-269x.00363. Acessado em 04 ago. 2022.

MENDONÇA, V.M.; SANTOS, M.J.C.; MOREIRA, F.V.; SILVA-MANN, R.; RIBEIRO M.J.B. Tradicional phytoterapy and integration and complimentary practices in the health

systems of Brazil. **Temas em Saúde**, João Pessoa, v. 18, n. 1, p. 66-97, 2018. Disponível em: <<https://temasemsaude.com/wp-content/uploads/2018/04/18105.pdf>>. Acesso em: 29 nov. 2021.

MICCICHE, A.; ROTHOCK, J.; YANG, Y AND RICKE, S. Essential oils as na intervention strategy to reduce *Campylobacter* in poultry production: A review. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, p. 1058, 2019. Doi: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01058>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01058/full>. Acesso em: 28 out. 22.

MOORE, J.E., BARTON, M.D., BLAIR I.S., CORCORAN D., DOOLEY J.S., FANING S., KEMPF I., LASTOVICA A.D., LOWERY C.J., MATSUDA M, MCDOWELL D.A., MCMAHON A., MILLAR B.C., RAO J.R., ROONEY PJ, SEAL B.S., SNELLING W.J., TOLBA O. The epidemiology of antibiotic resistance in *Campylobacter*. **Microbes and Infection**, v. 8, p. 1955-1966, 2006. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16716632/>. Doi.10.1016/j.micinf.2005.12.030. Epud 2006 Mar 31. PMID: 16716632.

MOURA, H.M.; SILVA, P.R.; SILVA, P.H. Antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* isolated from chicken carcasses in the Federal District, Brazil. **Journal of Food Protection**, v. 76, n. 4, p. 691-693, 2013. Disponível em: <<https://www.rearchgat.net/publication/23191656>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

MULLNER, P.; COLLINS-EMERSON, J.M.; MIDWINTER, A.C.; CARTER, P.; SPENCERE, S.E.F.; VAN DER LOGHT, P.; FRENCH N.P. Molecular epidemiology of *Campylobacter jejuni* in a geographically isolated with a uniquely structured poetry industry. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 7, p. 2154-2010, 2010. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20154115/>>. Acesso em: 27 nov. 2021.

NACHAMKIN, I. Microbiologic approaches for studying *Campylobacter* species in patients with Guillain-Barré syndrome. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 176, n. 2, p. 106-114, 1997. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/9396692/>>. Acesso em: 27 nov. 2021.

NACHAMKIN, I.; BARBOSA, P.A.; UNG, H.; LOBATO, C.; TIVERA, G.A.; RODRIGUES, P.; BRISENO, G.A.; CORDERO, M.L.; PEREA, G.L.; PEREZ, C.M.J.; VEITCH, J.; FITZGERALD, C.; CORNBLATH, D.; PINTO, R.M.; GRIFFIN, J.W.; WILLISON, H.J.; ASBURY, A.K.; MCKHANN, G.M. Patterns of Guillain-Barré syndrome in children: results from a Mexican population. **Neurology**, v. 69, n. 17, 2007. Disponível em: <<https://n.neurology.org/content/69/17/1665.short>>. Acesso em: 27 jul. 2021.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; and DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. <https://doi.org/10.3390/ph6121451>. **Pharmaceuticals**, v. 6, n. 12, p. 151-474, 2013. Disponível em: <https://www.mdpi.com/1424-8247/6/12/145>. Acesso em: 29 out. 22.

O PRESENTE RURAL. **O Presente rural**, 2019. Disponível em: <<https://opresenterural.com.br>>. Acesso em: 12 mar. 2020.

OECD – Organization for economic co-operation and development. **Series on Testing and Assessment**, n 129. Guidance document on using cytotoxicity tests to estimate starting doses

for acute oral systemic toxicity tests. Disponível em:
<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd-gd129.pdf>

O'BRYAN, C.A.; PENDLETON, S.J.; CRANDALL, P.G. and RICKE, S.C. Potential of plant essential oils and their componentes in animal agriculture-in vitro Studies on antibacterial mode of action. **Frontiers in Veterinary Science**. Doi: <https://doi.org/10.3389/fvets.2015.00035>. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fvets.2015.00035/full>. Acesso em: 29 out. 22

OPAS. Organização Pan-Americana da Saúde. **Semana mundial de conscientização sobre antibióticos**, 2018. Disponível em: <<https://www.paho.org/hq/index.php>>. Acesso em: 28 jul. 2021.

OPAS. Organização Pan-americana de saúde. **Trabalhando juntos para combater a resistência aos antimicrobianos**, 2020. Disponível em: <<https://www.paho.org/pt/juntos-combater-resistencia-antimicrobianos>>. Acesso em: 4 oct. 2020.

OPAS/OMS/BRASIL. **OMS publica lista de bactérias para as quais se necessitam novos antibióticos urgentemente**. Disponível em: <<https://www.apcd.org.br/index.php/noticias/766/em-foco/02-03-2017-publica-lista-de-bacterias-para-as-quais-se-necessitam-novos-antibioticos-urgentemente>>. Acesso em: 30 set. 2021.

OPAS/OMS/BRASIL. **Organização Pan-americana de saúde Relatório do diretor**, 2019. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5922:novo-relatorio-pede-acao-urgente-para-evitar-crise-de-resistencia-antimicrobiana&Itemid>. Acesso em: 4 oct. 2020.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.; KANEKO, T.M.; NISHIKAWA, S.O.; & FREITAS, B.R. (2008). Methods for Evaluation of the Antimicrobial activity and determination of Minimum Inhibitory Concentration (MIC) of plant extracts. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200026>. Disponível em: <<https://ww.scielo.br/j/rbfar/a/y8LwqybjgJB9hjwn9hjwn9c9yVn/wnetf?lang=pt>>. Acesso em: 28 out. 22.

ÖZIL, M.; MENTES, E.; YILMAZ, F.; SLAMOGLU, F.; KAHVECI, B. Synthesis of novel triazol compounds containing isatin as potential antibacterial and antifungal agents by microwave and conventional methods. **Journal of Chemical Research**, v. 35, n. 5, p. 268-271, 2011. Disponível em: <<https://journals.sagepub.com/doi/abs/10.3184/174751911X13043524455143>>. Acesso: 21 nov. 2021.

PURABI, R.; SAKIRA, A.; AVNISH, K.; RAMBIR, S.; POONAM, S.; VINOD, S. In vivo antioxidative, antimicrobial and wound healing activity of flower extracts of *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl) Miers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140, p. 186-192, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378874110000098>>. Acesso em: 27 nov 2021.

RANDALL, L.P.; RIDLEY, A.M.; COOLES, S.W.; SHARMA, M.; SAYERS, A.R.; PUMBWE, L. Prevalence of multiple antibiotic resistance in 443 *Campylobacter* spp. Isolated from humans and animals. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, p. 507-510, 2003. Disponível em: <<https://academic.oup.com/jac/article/52/3/507/776088>>. Acesso em: 22 nov. 2021.

REN, Q.C.; GAO, C.; XU, Z.; FENG, L.; LIU, M.; WU, X.; ZHAO, F. Bis-coumarin derivatives and their biological activities. **Current Topics in Medical Chemistry**, v. 18, n. 2, p. 101-113, 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29473509/>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

ROSSLER, E.; FUHR, E.M.; LORENZÓN, G.; ROMERO-SCHARPEN, A.; BERISVIL, A.P.; BLAJMAN, J.E.; ASTESANA, D.M.; ZIMMERMANN, J.A.; MARCIA, L.; FUSARI, SIGNORINI, M.L.; SOTO, L.P.; LAUREANO, S. F, ZBRUN, M.V. *Campylobacter jejuni* O:19 serotype in argentine poultry meat supply chain. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 49, n. 2, p. 178 -182, 2017.

SALIMIKIA, I.; BAHAMANI, M.; ABBASZADEH, S.; RAFIEIAN-KOPAEI; & NAZER, M.R. 2020. *Campylobacter*: A Review of new promising with medicinal plants and natural antioxidants. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 15, p. 1462-1474. <https://doi.org/10.2174/13895575206662001171464>. Disponível em: <https://ww.eurekaselect.com/article/103738>. Acessado em: 10 oct. 22.

SCOTT, H.M., ACUFF, G.; BERGERON, G.; BOURASSA M.W.; GILL, J.; GRAHAM D.W.; KHAN, L.H.; MORLEY, P.S.; SALOIS, M.J.; SIMJEE, S.; SINGER, R.S.; SMITH, T.C.; STORRS, C.; WITTUW, T.E. Critically important antibiotics: criteria and approaches for measuring and reducing their use in food animal agriculture. **Annals of the New York Academy of Sciences**, 1441, n. 1, p. 16, apr. 2019. Doi: 10.1111/nyas.14058. Doi: 10.1111/nyas.14058. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6850619/>. Acesso em: 01 nov.2022.

SENASA - Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. **Resolución-594-2015-SENASA**. Ministério de Agricultura, Genadería y Pesca, 2015. Disponível em: <<https://www.senasa.gov.ar/normativas/resolucion-594-2015-senasa-seervicio-nacional-sanidad-ycalidad-agroalimentaria>>. Acesso em: 23 nov. 2021.

SHARMA, V.; KUMAR, P.; PATHAK, D.; Biological importance of the indole nucleus in recent years: a Comprehensive review. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 47, n. 3, p. 3, p. 491-502, 2010. Doi: 10.1002/jhet.349. Disponível em: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/jhet.349>. Acesso em: 17 oct. 2022.

SILVA, B.N.M.; BASTOS, R.S.; SILVA, B.V.; PINTO, A.C. Preparation of 5-nitroisatin and 5-cholisatin from isonitrosoacetanilide. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2279-2282, 2010. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/qn/a/dwcRFQ3vHv5YVQ5Tz6q7GkL/?lang=pt>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

SILVA, Thaysa Suellen Mendonça da. **Síntese assistida por micro-ondas de tiossemicarbazona derivadas da isatina com potencial atividade biológica**. 99 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências exatas e da Natureza, Programa de Pós-graduação em Química, Joao Pessoa, 2018. Disponível em:

<https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/14119?locale=pt_BR>. Acesso em: 27 jun. 2021.

SMITH, T.; TAYLOR. Some morphological and biological caracteres of the sipirilla (*Vibrio fetus*, n. sp.) associated with disease of the fetal membranes in cattle. **Journal of Experimental Medicine**, v. 30, n. 4, p. 299-311, 1919. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2126685/>>. Acesso em: 29 nov. 2021.

SVS - Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. **Análise epidemiológica dos surtos de doenças transmitidas por alimentos no Brasil**. Brasília, DF: Secretaria de Vigilância em Saúde, 2019. Disponível em: <<https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/fevereiro/15/Apresenta-o-Surtos-DTA-Fevereiro-2019.pdf>>. Acesso em: 27 jun. 2021.

TENG, Y.O.; ZHAO, H.-Y.; WANG, J.; LIU, H.; GAO, M.-L.; ZHOU, Y.; HAN, K.L.; FAN, Z.C.; ZHANG, Y.M.; SUN, H.; YU, P. Synthesis and anti-cancer activity evaluation of 5- (2-carboxyethenyl) -isatin derivatives. **European Journal Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 112, p. 145–156, 2016. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/26890120/>>. Acesso em: 27 nov. 2021.

THERANI, K.H.M.E.; HASHEMI, M.; HASSAN, M.; KOBARFARD, F.; MOHEBBI, S. Synthesis and antibacterial activity of Schiff bases of 5-substitute isatins. **Chinese Chemical Letters**, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1001841715004210>>. Acesso em: 29 jul. 2021.

THEOBALDO, S.M.D. Further Studies on the etiological rôle of vibrio fetus. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 32, p. 683-689, 1920. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/aceso-a-informação/acoes-e-programas/sislab/publicacoes/manual_tecnico_diagnostico_laboratorial_campylobacter.pdf/view>. Acesso em: 23 oct. 22.

TOLEDO, Z.; ZIMZLUIZA, R.J.; FERNANDEZ, H. Occurence and antimicrobial resistance of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolated domestic animals from Socthern Ecuador. **Ciência Rural**, v. 48, n. 11, p. e20180003, 2018. Disponível em: <<https://www.scielo.br/j/cr/a/jgQ7nK36DBNHwTpvGscB4R/?lang=en>>. Acesso em: 27 nov. 2021.

VANDANA, K.; MARATHAKAM, A.; THUSHARA, B.S.; RAJITHA, K. A review on isatin derivatives with diverse biological activies. **Word Journal Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 16, p. 318-332, 2017. Disponível em: <https://wjpr.s3.ap.soth-1.amazonaws.com/article_issue/1512023583.pdf>. Acesso em: 27 nov. 2021.

VÉRON, M.; CHATERLAIN, R. Taxonomic study of the genus *Campylobacter* Sebald and Véron and designation of the neotype strain for the type species *Campylobacter fetus* (Smith and Taylor) Sebald and Véron. **International Journal of Systematic Bacteriology**, Ames, n. 23, p. 122-134, 1973.

VINIK, A.I.; RAYMOND, e. pancreatic neuroendocrine tumors: approach to treatment with focus on sunitinib. **Therapeutic advances in gastroenterology**, v. 6, n. 5, p. 396-411, 2013.

Doi 10.1177/1756283X13493878. Disponível em: <https://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1756283X13493878>. Acesso em: 17 oct. 2022.

WHO - World Health Organization. **Antimicrobial resistance: global report on Surveillance**. World Health Organization, Geneva, 2014. Disponível em: <<http://www.who.int/drugresistance/documents/surveillancereport/en> > Acesso em: 14 jan. 2017.

WHO - World Health Organization. **Antimicrobial resistance**. World Health Organization, Geneva, 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-rom/factsheets/datail/antimicrobial-resistance>>. Acesso em: 27 jun. 2021.

WHO - World Health Organization. **WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed**. World Health Organization, Geneva, 2017. Disponível em: <<https://www.who.int/news/item/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed>>. Acesso em: 6 Abr. 2021.

XU, J.; YI-LEI, F.; ZHOU, J. Quilone-triazole and their biological activities. **Journal of Heterocyclic Chemistry**, v. 55, n. 8, p. 1854-1862, 2018. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com>>. Acesso em: 26 nov. 2021.

YANG, Y.; KRISTINA, M.; SHI, Z.; PAVALIDIS, O.H.; KOGUT, M.; ASHWORTH, J.A. RICKE C.S. Historical review on antibiotic resistance of foodborne *Campylobacter*. **Frontiers in Microbioly**, v. 10, 2019. Disponível em: <<https://www.fronteirsin.org/articles.org/articles/10.3389/fmicb.2019.01509/full>>. Acesso em: 23 nov. 2021.