



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS E TECNOLOGIA AGROALIMENTAR
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM SISTEMAS
AGROINDUSTRIAIS**

MARCUS VINICIUS DE MELO GALDINO

**ESTUDO DA AÇÃO INIBITÓRIA DE PRÓPOLIS ASSOCIADA À ANTIBIÓTICOS
COMERCIAIS SOB CEPAS PADRÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

POMBAL – PB

2020

MARCUS VINICIUS DE MELO GALDINO

**ESTUDO DA AÇÃO INIBITÓRIA DE PRÓPOLIS ASSOCIADA À ANTIBIÓTICOS
COMERCIAIS SOB CEPAS PADRÃO DE *STAPHYLOCOCCUS AUREUS***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande – UFCG, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, *Campus Pombal*, PB, em cumprimento às exigências necessárias ao Título de Mestre, com área de concentração em Ciências e Tecnologia em Sistemas Agroindustriais.

Orientadora: D.Sc. Alfredina dos Santos Araújo

POMBAL – PB

2020

G149e Galdino, Marcus Vinícius de Melo.
Estudo da ação inibitória de própolis associada à antibióticos comerciais sob cepas padrão de Staphylococcus Aureus / Marcus Vinícius de Melo Galdino. – Pombal, 2020.
40 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais) –
Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e
Tecnologia Agroalimentar, 2020.

"Orientação: Prof. Dr. Alfredina dos Santos Araújo".
Referências.

1. Atividade antibacteriana. 2. Própolis vermelha. 3. Patógenos. 4.
Modulação. I. Araújo, Alfredina dos Santos. II. Título.

CDU 638.135(043)

MARCUS VINICIUS DE MELO GALDINO

ESTUDO DA AÇÃO INIBITÓRIA DE PRÓPOLIS ASSOCIADA À
ANTIBIÓTICOS COMERCIAIS SOB CEPAS PADRÃO DE
STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais da Universidade Federal de Campina Grande - UFCG, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, *Campus Pombal*, PB, em cumprimento às exigências necessárias ao Título de Mestre, com área de concentração em Ciências e Tecnologia em Sistemas Agroindustriais.

Orientadora: D.Sc. Alfredina dos Santos Araújo

Aprovada em 15/07/2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Doutor

Prof. D.Sc. Alfredina dos Santos Araújo
Orientadora CCTA/PPGSA/UFCG

Rosilene da Silva Agra

Prof. D.Sc. Rosilene da Silva Agra
Examinador Interno CCTA/UFCG

Antonio Fernandes Filho

Prof. D.Sc. Antônio Fernandes Filho
Examinador Interno CFP/UFCG

Gilcean da Silva Alves

Prof. D. Sc. Gilcean da Silva Alves
Examinador Externo/ IFPB

POMBAL - PB

*Com amor infinito, carinho e muita saudade.
Dedico aos meus anjos In Memória: Vovó Nina e
Vovô Chico, avôs dotados de muita sabedoria
que com suas singelas palavras me confortavam,
que com seus gestos verdadeiros me faziam sorrir
e com seu amor incomparável e incondicional
fortaleciam e alicerçavam minha vida, e assim
me ensinou ser a pessoa que hoje sou. Amo vocês
infinitamente e eternamente...*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me presenteado o dom da vida e todas as experiências vividas, que serviram como lições adaptativas, dificuldades superadas, desafios vivenciados e a vitória de ter um sonho conquistado, mas pintado em cores fortes e reais. Você me ajudou nos momentos mais difíceis e me deu forças para chegar até aqui. O meu DEUS é o DEUS do impossível.

Aos meus pais, José Galdino e Maria de Fátima, e meu irmão Marcelo Vitor pelo grande exemplo de esforço e dedicação. Obrigado por sempre acreditarem em mim e nos meus sonhos. Obrigado por tudo aquilo que vocês me ensinaram e pelo apoio principalmente nos momentos de dificuldades que enfrentamos. Vocês são a base na minha vida, e esta base é muito sólida, pois foi construída com muito amor e sabedoria. Pois vocês são o maior orgulho da minha vida. Aos meus Avós, Tios, Tias, Primos, Primas e um obrigado especial a minha afilhada Maria Heloyse, pois vocês sempre me incentivaram e me deram força durante toda minha trajetória acadêmica.

A todos os meus amigos que estão sempre comigo, um obrigado de forma especial por compartilharem comigo na alegria e na tristeza, fazendo jus a um aprendizado na vida e por me fazerem sentir o verdadeiro sentido de Amizade, pois cada um sabe o valor peculiar representado na minha vida.

A minha turma do Mestrado principalmente aos amigos Flávia Nayanna e Maria Elisabete e todos os outros que direta ou indiretamente colaboraram para a realização desse sonho. Vocês fizeram das minhas noites mais alegres e divertidas e é assim que juntos iremos seguir e venceremos as batalhas da vida.

A Empresa Brasileira de Correios e Telégrafos, a qual me acolheu para a vida profissional por sempre estar à disposição nos momentos que mais necessitei durante toda a minha vida acadêmica.

Aos mestres, funcionários e participantes do Centro Vocacional Tecnológico, pela disposição em ajudar no que deles dependesse para a conclusão da pesquisa, embora, muitas vezes se encontrassem assoberbados pelas suas atividades pessoais e acadêmicas. Transmitindo valores, percepções e pensamentos, no qual tudo foi possível, pois vocês foram competentes em repassar os ensinamentos, a qual me espelharei para ir mais além. Aos amigos Bruno Ferreira e Michel por toda paciência, disponibilidade, atenção e auxílio na produção desta.

A minha Orientadora D.Sc. Alfredina dos Santos Araújo por ter acreditado em meu potencial, pelo apoio técnico, pela paciência, pela alegria, pelo carinho, confiança e principalmente pelo companheirismo nesta importante etapa da minha vida acadêmica, meu grato e grandioso obrigado, para mim você é um exemplo de profissional e de mulher a ser seguido.

Aos caríssimos professores D. Sc. Rosilene Agra, D.Sc. Gilcean Alves e D.Sc. Antônio Fernandes pela colaboração e ricas sugestões que serviram para crescimento, aprendizado e incentivo e por terem aceitado o convite, é um prazer imenso tê-los como membros da banca examinadora.

Enfim, a todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para que este caminho pudesse ser concluído.

Que eu jamais esqueça que DEUS me ama infinitamente, que um pequeno grão de alegria e esperança dentro de cada um é capaz de mudar e transformar qualquer coisa, pois... A vida é construída nos sonhos e concretizada no amor.

(Chico Xavier)

RESUMO

GALDINO, M. V. M. **Estudo da ação inibitória de própolis associada à antibióticos comerciais sob cepas de *Staphylococcus Aureus* 2020**. 41f. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais: Ciência e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Sistemas Agroindustriais, Universidade Federal de Campina Grande. Pombal, 2020.

Os produtos naturais possuem ampla aplicação terapêutica por apresentarem em sua composição química, atividade antimicrobiana frente a diversos microorganismos e por serem uma alternativa eficaz para o tratamento de inúmeras doenças infecciosas. Várias literaturas têm indicado que a própolis possui um grande potencial terapêutico, destacando as atividades, antioxidante, antimicrobiana e anti-inflamatória. A própolis vermelha é uma resina de coloração variada coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes das plantas. A principal origem provém da *Dalbergia ecastophyllum*, popularmente conhecida como rabo-de-bugio, encontrada ao longo de praias e regiões de manguezais do nordeste brasileiro. *Staphylococcus aureus* é uma bactéria esférica do grupo dos gram positivos, um patógeno responsável por uma ampla variedade de síndromes clínicas, com atuação variando das infecções mais simples até mais invasivas. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha, sobre cepas de *staphylococcus aureus* associados com antibióticos comerciais. A concentração inibitória mínima foi determinada pelo método de microdiluição em poços diluída sequencialmente pelo título 1:2 e serviu para avaliação das substâncias como moduladoras da resistência aos antibióticos. Em seguida, foi realizada a atividade moduladora da ação dos antibióticos, utilizando-se a concentração subinibitória do extrato e os antibióticos em concentrações decrescentes, partindo de 1024µg/mL, diluídas sequencialmente até 16µg/mL. Os resultados dos testes mostraram que o extrato da própolis vermelha possui atividade antimicrobiana clinicamente relevante para *Staphylococcus aureus*, pois o valor do CIM foi abaixo de 1024 µg/mL. Os antibióticos Benzetacil demonstraram atividade antibacteriana contra essa cepa, enquanto que o Ciprofloxacino demonstrou não possuir este tipo de ação. Não foi observado efeito sinérgico quando associamos o extrato ao antibiótico Ciprofloxacino na modulação, fato este que se tornou idêntico a CIM, pois o fato pode estar relacionado aos receptores de ligação tanto no medicamento como também na bactéria testada, e aos componentes químicos da própolis vermelha. Entretanto a própolis caracteriza ser mais rentável, contribuindo positivamente para assegurar melhores resultados e haver o controle e/ou diminuição e custos no tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus*.

Palavras-chave: atividade antibacteriana, própolis vermelha, patógenos, modulação.

ABSTRACT

GALDINO, M. V. M. Study of inhibitory action of propolis associated with commercial antibiotics under strains of *Staphylococcus Aureus* 2020. 41f. Dissertation (Master's degree in Agro-Industrial Systems: Food Science and Technology). Graduate Program in Agroindustrial Systems, Federal University of Campina Grande. Pombal, 2020.

Natural products have a wide therapeutic application because they present antimicrobial activity in their chemical composition against several microorganisms and because they are an effective alternative for the treatment of numerous infectious diseases. Several literatures have indicated that propolis has a great therapeutic potential, highlighting the activities, antioxidant, antimicrobial and anti-inflammatory. Red propolis is a resin of varied color collected by bees of the species *Apis mellifera* from various parts of the plants. The main origin comes from *Dalbergia ecastophyllum*, popularly known as howler tail, found along beaches and mangrove regions of northeastern Brazil. *Staphylococcus aureus* is a spherical bacterium of the gram-positive group, a pathogen responsible for a wide variety of clinical syndromes, with action ranging from the simplest to the most invasive infections. In this context, this study aimed to evaluate the antibacterial activity of the hydroalcoholic extract of red propolis on *staphylococcus aureus* strains associated with commercial antibiotics. The minimum inhibitory concentration was determined by the microdilution method in wells diluted sequentially by the title 1:2 and served to evaluate the substances as modulators of antibiotic resistance. Then, the modulating activity of the action of antibiotics was performed, using the subinhibitory concentration of the extract and antibiotics in decreasing concentrations, starting from 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$, sequentially diluted up to 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$. The results of the tests showed that the extract of red propolis has clinically relevant antimicrobial activity for *Staphylococcus aureus*, because the MIC value was below 1024 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Benzetacil antibiotics showed antibacterial activity against this strain, while Ciprofloxacin showed no action. No synergistic effect was observed when we associated the extract with the antibiotic Ciprofloxacin in modulation, a fact that became identical to MIC, because the fact may be related to binding receptors both in the drug and also in the bacteria tested, and to the chemical components of red propolis. However, propolis characterizes to be more profitable, contributing positively to ensure better results and to have control and/or decrease and costs in the treatment of *Staphylococcus aureus* infections.

Keywords: antibacterial activity, red propolis, pathogens, modulation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Determinação da concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato de própolis vermelha.....	25
--	-----------

Lista de Figuras

Figura 1 <i>Dalbergia Ecastophyllum</i> (L) Taub	14
Figura 2 Secreção resinosa da própolis vermelha.....	15
Figura 3 Extrato hidroalcoólico da própolis vermelha.....	21
Figura 4 Fluxograma da Concentração Inibitória Mínima.....	23
Figura 5 Fluxograma da atividade moduladora	24
Figura 6 Placa de microdiluição avaliada na CIM	27
Figura 7 Placa avaliada no processo de Modulação.....	29

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

CFP – Centro de Formação de Professores

CIM – Concentração inibitória mínima

HIA – *Agar Heart Infusion*

PB – Paraíba

UFC – Unidade formadora de colônia

UFC/mL – Unidade formadora de colônia por mililitro

UFMG – Universidade Federal de Campina Grande

µg/mL – Microgramas por mililitro

µL - Microlitro

Lista de Quadro

Quadro 1 Informações sobre as leveduras do gênero <i>Staphylococcus aureus</i> utilizadas na pesquisa de acordo com INCQS/CMRVS/FIOCRUZ.....	23
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	12
2.1 OBJETIVO GERAL.....	12
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
3.1 PRÓPOLIS	13
3.2 PRÓPOLIS VERMELHA E SUA ORIGEM BOTÂNICA	14
3.3 <i>STAPHYLOCOCCUS AUREUS</i>	17
3.3.1 Patogenicidade principais infecções causadas por <i>Staphylococcus aureus</i>	18
3.3.2 Tratamento e resistência de <i>Staphylococcus aureus</i> aos antimicrobianos	19
4 MATERIAIS E METODOS.....	22
4.1 LOCAL DA PESQUISA	22
4.2 MATERIAIS	22
4.3 ATIVIDADE CONTRA BACTÉRIAS	23
4.3.1 Concentração Inibitória Mínima - CIM	24
4.3.2 Modulação	25
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 Determinação da Concentração inibitória mínima (CIM)	27
5.2 Modulação.....	29
6 CONCLUSÃO.....	31
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS... ..	32

1 INTRODUÇÃO

A opção por novas formas terapêuticas, a exemplo da própolis segue no foco das pesquisas por conter na composição química grupos fenólicos, os quais contribuem para as propriedades terapêuticas, a exemplo do potencial antibacteriano, anti-inflamatório, antiviral, antifúngico e imunomodulatório. Dentre estas propriedades biológicas, a atividade antibacteriana tem destacado atenção (BUENO-SILVA et. al., 2016; FREIRES et. al., 2016; GOMES et. al., 2016).

A própolis tem sido empregada como um importante fitoterápico, por apresentarem propriedades biológicas e farmacoterapêuticas que a coloca como uma possível alternativa ao uso dos antibióticos, porém é necessária uma padronização das doses e do extrato (SFORCIN & BANKOVA, 2011).

A própolis é uma substância resinosa de coloração e consistência variada, coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diferentes exsudatos de plantas. Abelhas utilizam esta resina para selar e proteger as colmeias contra a proliferação de microorganismos, como fungos e bactérias. É utilizado há muitos anos na medicina popular, por apresentar diversas propriedades biológicas (ANAUATE NETO et al., 2013).

A composição química da própolis é determinada pelas características fitogeográficas existentes na localização da colmeia. Porém ela é influenciada sazonalmente, o que pode proporcionar uma variação em sua atividade farmacológica. Atualmente existe 13 tipos de própolis localizadas em diversas regiões do Brasil, decorrentes da biodiversidade e das localizações geográficas do país. A própolis verde é a mais estudada, porém a própolis vermelha desperta interesse por ser um tipo de própolis rara encontrada na região Nordeste (ALENCAR et al., 2007).

Um novo tipo de própolis teve sua origem britânica identificada como, *Dalbergia ecastaphyllum*, *L. Taub*, conhecida como rabo-de-bugio, uma espécie leguminosa da região nativa do estado de Alagoas na qual produz uma seiva avermelhada. Esta seiva denomina-se própolis vermelha, por causa da sua coloração vermelha intensa e por apresentar várias atividades biológicas (LOPEZ et al., 2011).

Conforme os estudos de DUARTE et al (2018) *Staphylococcus aureus*, este é considerado uma bactéria pertencente ao grupo dos gram-positivos, e está presente na microbiota humana, podendo causar desde um simples processo inflamatório, como espinhas e furúnculos até evoluindo a patologias mais sérias como: endocardites, meningites,

pneumonia, choque sépticos entre outras. Sendo, também, encontrado nas fossas nasais ou na pele de neonatos, crianças e adultos, e a partir desses sítios, alcançar outras regiões da pele e das mucosas. Caso as barreiras naturais, isto é, pele e mucosas, estejam comprometidas por trauma ou cirurgia, o *Staphylococcus aureus* pode alojar no tecido e provocar uma lesão local.

Um grande número de cepas bacterianas como as *Staphylococcus aureus*, apresentam alta taxa de morbidade e mortalidade, fazendo com que haja uma vigilância local quanto aos padrões de sensibilidades aos antibacterianos (LUNA et al., 2010). E por isso é necessário considerar que a própolis, dentre os antibióticos naturais, se destaca por apresentar um conjunto de substâncias benéficas na sua composição, tal como flavonoides, as quais são indicadas como responsáveis pelas ações terapêuticas e possui um baixo custo, por ser de fácil acesso a população quanto ao seu uso terapêutico, assim como pode apresentar atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus* (LUPION, CAMACHO, NEGRI, 2013).

É necessário considerar que a própolis tem um baixo custo, por ser de fácil acesso à população, não existindo contraindicações quanto ao seu uso terapêutico, podendo apresentar atividade antibacteriana sobre a *Staphylococcus aureus*. Esse fato motivou-me para a realização desta pesquisa, além da própolis vermelha ser pouco conhecida e divulgada entre a sociedade de modo geral (profissionais da área da saúde e pessoas leigas). Apesar da relevância apresentada pela própolis, ainda requer mais estudos acerca deste produto natural, para subsidiar o uso de antibióticos e analisar futuramente seus efeitos como alternativa para diminuir o alto índice de resistência aos antibióticos atualmente comercializados. Nesse sentido, este estudo foi desenvolvido com o objetivo de avaliar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* associados aos antibióticos comerciais.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico da própolis vermelha, sobre cepas de *Staphylococcus aureus* associados aos antibióticos comerciais.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o desenvolvimento das cepas de *Staphylococcus aureus* ao longo da sua incubação em placa de microdiluição;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato da própolis vermelha contra cepas de *Staphylococcus aureus*;
- Avaliar a atividade antibacteriana do extrato da própolis vermelha em associação com Benzetacil e Ciprofloxacino;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PRÓPOLIS

A própolis tem atraído o interesse dos pesquisadores nas últimas décadas, devido a várias propriedades biológicas e farmacológicas, mas, sabe-se que durante séculos vem sendo administrada extensivamente sob diferentes formas de uso pela humanidade desde os tempos remotos (SFORCIN, BANKOVA, 2011).

A própolis, (do grego pro: pra, em defesa e polis: cidade ou comunidade) é uma resina de coloração e consistência variada e coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera*, através dos ramos, flores, pólen, brotos, nas quais irão produzir cera para elaboração do produto final (FREIRES et al., 2016).

Na Europa, América do Norte e oeste da Ásia, a fonte dominante de própolis é o exudato do botão de álamo (*Populus* sp.). Entretanto, na América do Sul a espécie vegetal do gênero *Populus* não é nativa, existindo uma grande diversidade vegetal para retirada de resina, o que dificulta a correlação da própolis com a fonte produtora. Outras espécies vegetais empregadas como fontes de própolis em várias partes do mundo são pinheiros, carvalho, salgueiro, acácia, entre outras (LUSTOSA et al., 2008).

Os produtos fitoterápicos possuem ampla aplicação terapêutica por possuírem efeitos antimicrobianos frente a diversos microrganismos e por serem um método viável para o combate de inúmeras patologias infecciosas. De acordo com vários estudos científicos foram indicados que a própolis possui várias propriedades terapêuticas, entre elas ação anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante (SANTOS; DAVID, 2017).

Segundo Sforcin & Bankova (2011) a própolis era empregada para várias utilidades, na colmeia, tais como selar fissuras ou vedar espaços e embalsamar insetos invasores, que possa infectar a colônia. Há outros relatos que a própolis era utilizada como um medicamento na medicina local e popular em diversas localidades do corpo humano (GOMES et al., 2016). Com o objetivo de embalsamar seus mortos, evitar a putrefação dos corpos, agente antisséptico e cicatrizante, agentes antipiréticos por diferentes povos da antiguidade (PETER et al., 2017).

Até o momento, foram identificados 13 tipos de própolis, caracterizados de acordo com suas características físico-químicas, que variam desde o amarelo-esverdeado, passando pelo marrom avermelhado ao negro (RODRIGUES, 2015).

A composição química da própolis se dá pelas características fitogeográficas, variando de acordo com a sazonalidade, interferindo o seu potencial de ação (BITTENCOURT et al.,

2014). Há uma grande diversidade de própolis no Brasil, sendo esta variação decorrente da biodiversidade da região habitada pelas abelhas, assim como também da variedade genética da abelha que a produziu (GOMES et al., 2016).

O melhor indicador da origem botânica da própolis é análise da sua composição química comparada com a provável fonte vegetal. A determinação da origem geográfica e, principalmente, a origem vegetal, se faz importante no controle de qualidade e até mesmo na padronização das amostras de própolis para uma efetiva aplicação terapêutica (LUSTOSA et al., 2008).

Vale salientar que a composição química é composta por aproximadamente 60% de resinas e bálsamos aromáticos, 30 - 40% de ceras, 5 – 10% de óleos essenciais e até 5% de outras substâncias. Além de microelementos presentes como alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, magnésio, titânio, silício, zinco, bromo e vitaminas do complexo B1, B2, B6, C e E (ROBERTO et al., 2016).

De acordo com Andrade et al (2017), extratos etílicos de diferentes espécies de própolis (marrom, verde e vermelha) caracterizam grupos flavonoides e compostos fenólicos. Sendo assim alguns estudos apontam o alto teor de flavonoides estão ligados com o poder antioxidante, antiviral, antiúlceras, cicatrizante, e antibiótica frente as bactérias gram + (CABRAL et al., 2009).

Atualmente, vários trabalhos têm sido revisados e publicados sobre as propriedades farmacológicas e biológicas da própolis como anti-inflamatório e até mesmo um grande inibidor cancerígeno. Destacando também outras propriedades que a mesma possui, como: antimicrobianos, antioxidantes, imunomodulador, anestésico (SOUZA; FISHER; VARGAS, 2013). Portanto o Brasil ocupa destaque entre os maiores produtores de própolis, devido a sua variedade da flora, assim como também uma vasta gama de propriedades biológicas que a mesma possui (RODRIGUES, 2015).

3.2 PRÓPOLIS VERMELHA E SUA ORIGEM BOTÂNICA

A própolis é uma resina de coloração variada coletada por abelhas da espécie *Apis mellifera* de diversas partes das plantas (LOPES et al., 2015). A principal origem botânica da própolis vermelha provém da *Dalbergia ecastophyllum* (L) Taub (Figura 1), popularmente conhecida como rabo-de-bugio, encontrada ao longo de praias e regiões de manguezais do nordeste brasileiro (LOPEZ et al., 2011).

Figura 1: *Dalbergia Ecastophyllum (L) Taub*



Fonte: Google Imagens.

Conforme as características físico-químicas, foi encontrado um novo tipo de própolis, denominada própolis vermelha, por apresentar coloração vermelha intensa (Figura 2) classificado como própolis do grupo 13. E tem evidenciado uma efetiva aplicação terapêutica no que concerne a propriedades biológicas que a mesma possui (DAUGSCH et al., 2008).

Figura 2: Secreção resinosa da própolis vermelha



Fonte: Apacame (2018)

A própolis vermelha encontrada em diversas localidades fitogeográficas, pode interferir na composição química, porém pode variar sazonalmente na mesma localidade,

diferenciando apenas em suas atividades farmacológicas (BITTENCOURT et al., 2014). A própolis vermelha do Nordeste do Brasil, as denominadas do grupo 13, possui grande semelhança com a própolis da Cuba no que se trata ao alto teor de flavonoides presentes (BEZERRA, 2015).

A composição química e as atividades biológicas da própolis vermelha dependem muito de diversos aspectos, por exemplo: variação de temperatura, pluviosidade, pasto apícola, sazonalidade e entre outros (NUNES et al., 2009). A alteração do pasto apícola, assim como as mudanças climáticas, pode interferir diretamente na alteração do produto natural em sua composição química, tornando difícil a padronização do produto para comercialização (RODRIGUES, 2015).

Segundo Frozza et al (2013) ao abordar os principais compostos do extrato da própolis vermelha da região nordeste do Brasil, mais precisamente no estado do Sergipe, indica que a mesma é composta de moléculas complexas, e detém uma vasta propriedade farmacobiológica essencial na eliminação de radicais livres, assim como também na inibição de células tumorais em fase de crescimento.

Diversos estudos concluem que o efeito da sazonalidade, temporalidade e outros fatores, são importantíssimos na caracterização da matéria prima de uma região, onde cada produto natural é obtido (OLDONI et al., 2011).

Quando avaliada a atividade antibacteriana da própolis vermelha, constatou que extratos obtidos de algumas regiões brasileiras possui melhor ação farmacobiológica, quando comparada a outros extratos de outras regiões norte americanas (BISPO et al., 2012).

De acordo com Alencar et al. (2007) verificaram que o extrato etanólico da própolis vermelha possui uma potente ação antibacteriana e antimicrobiana frente as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Streptococcus mutans* (UA 159). Outros estudos evidenciaram ação antimicrobiana em *Escherichia coli*, *Enterococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *Staphylococcus mutans* (SIQUEIRA et al., 2014). Segundo Daugh et al. (2007) demonstraram que a própolis vermelha brasileira da região Nordeste, evidenciou atividade antimicrobiana frente as cepas de *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), em concentrações próximas a 2,5 ug/ml.

As propriedades químicas da própolis apresentam importante valor farmacológico como um complexo natural e não como uma fonte de compostos que atuam isoladamente. Para que haja a potencialização da ação de antibióticos e diminuir a incidência de efeitos

colaterais, se faz necessário a associação a produtos de efeito antimicrobiano, principalmente de origem natural (SILVA et al., 2017).

De acordo com Araujo e Marcucci (2011) o sinergismo *in vitro* entre própolis e drogas antimicrobianas foi investigado, e as fórmulas que associam a própolis a antibióticos são de interesse médico potencial. Devido ao possível desenvolvimento de resistência a medicamentos por bactérias, esse sinergismo é relevante e mostra que a própolis pode ser uma opção viável de tratamento para esses patógenos. A própolis combinada com agentes antimicrobianos poderia permitir doses mais baixas do antibiótico incluído, além de potencializar a droga e, portanto, seu potencial médico, principalmente para uso tópico

Embora estudos indiquem presença de compostos de natureza antioxidante da própolis, portanto a investigação sugere que sejam realizadas pesquisas com extratos de diferentes concentrações e substâncias, a fim de testar a ação antibacteriana e antimicrobiana destes (BEZERRA et al., 2015).

3.3. STAPHYLOCOCCUS AUREUS

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é uma das causas mais frequentes de infecções hospitalares. Com o aumento de várias cepas resistentes a medicamentos, produtos naturais como a própolis são uma estratégia para a descoberta de novos produtos (PAMPLONA-ZOMENHAN et al., 2011).

Pertencente à família Micrococcae, possui 33 espécies de gênero, dentro delas, 17 podendo ser isoladas de material biológico humano. O qual faz parte do ambiente comensal do homem por trazer maior interesse, em virtude de ser o principal causador de infecções oportunistas ou não das áreas hospitalares (DUARTE et al., 2018).

De acordo com CASSETTARI, STRABELL, MEDEIROS (2005), essa bactéria se apresenta na forma de cocos Gram e catalase positivo, medindo aproximadamente 0,5 a 1,5 μm de diâmetro, geralmente não encapsulados, imóveis, não esporulados podendo apresentar-se em diversas formas, aos pares, em cadeias curtas, ou agrupadas irregularmente, com aspecto semelhante a um cacho de uvas e atualmente se trata de uma bactéria mais comum nas infecções piogênicas em todo o mundo.

As espécies de *Micrococcus* e de *Staphylococcus* produzem colônias características em ágar sangue de carneiro. Após um certo período, as colônias de micrococos têm de 1,0 a 2,0 mm de diâmetro, são opacas, marcadamente convexas com borda contínua e algumas

cepas produzem pigmento amarelado, rosado, alaranjado ou bronzeado, outras esbranquiçadas ou branco-osso (SANTOS et al., 2007).

As cepas de *Staphylococcus aureus* crescem em meios comuns, caldo ou ágar simples, pH igual a 7, e temperatura entre 35-37 °C. Formam colônias arredondadas, lisas e brilhantes, apresentando cores que vão do acinzentado ao dourado bem leve, após 24 horas, podendo-se observar crescimento entre 24 – 48 horas, após incubação. Essa espécie se desenvolve também na presença de 7,5% de NaCl, estimulando a produção de coagulase, enzima que caracteriza a espécie (KONEMAN et. al, 2001).

Os *Staphylococcus aureus* possui grande resistência, à dessecação e ao frio, podendo ser transportados e viver em grãos de poeira. O homem é o seu principal meio de cultura, pois habita por quase todo o sistema fisiológico, desde o sistema respiratório, passando por intestinos até a própria pele. As narinas são seu maior campo de colonização, cerca de 40%. Então, se torna evidente que as pessoas do âmbito hospitalar, funcionam como verdadeiros meios de cultura para esta bactéria. Essa colonização assintomática tem grande importância clínica, uma vez que, com as narinas colonizadas, o indivíduo contamina as próprias mãos e passa a ser veículo de transferência da bactéria no mecanismo de infecções por contato (CARVALHO et al., 2005).

3.3.1 Patogenicidade e principais infecções causadas por *Staphylococcus aureus*

O referido microorganismo é encontrado no ambiente de circulação do ser humano, sendo o homem, o principal hospedeiro definitivo. Além de estar presente em diversas partes do corpo como fossas nasais, pele, garganta e intestino. Dessas cavidades anatômicas, as narinas são as que possuem maior índice de colonização, principalmente quando se contrai no interior de hospitais (DUARTE et al., 2018).

Conforme os estudos de Ferreira (2017) *Staphylococcus aureus* são microorganismos gram positivos aeróbios, é o mais patogênico: em geral causa infecções de pele e algumas vezes pneumonia, endocardite, amigdalite e osteomielite. Na maioria das vezes provoca a formação de abscesso. Algumas cepas elaboram toxinas que provocam gastroenterite, síndrome da pele escaldada e síndrome do choque tóxico.

A amigdalite é uma infecção das amígdalas palatinas que ocorre principalmente em crianças e adultos jovens, e a amigdalite recorrente está entre as doenças infantis mais comuns (CAVALCANTI et al., 2019).

A colonização nasal por *Staphylococcus aureus* é desprovida de sintomas, uma vez que o indivíduo não desenvolve o processo infeccioso. Além da virulência este patógeno é notório pela rápida evolução de resistência aos antibacterianos e antimicrobianos (FERREIRA et al., 2009). Essa colonização assintomática tem grande importância clínica, pois uma vez as narinas infectadas, elas servem de carreamento e o indivíduo passa as próprias mãos, contribuindo como um agente vetor de transferência da bactéria no mecanismo de infecção por contato (SANTOS et al., 2007).

É a bactéria mais comum em infecções ósseas, artrites sépticas e infecções de próteses ósseas, por caracterizar dificuldades de tratamento por antibioticoterapias a longo prazo. E isso está no fato da bactéria ser capaz de expressar numerosas proteínas, denominadas adenosinas que se aderem à superfície de ossos (DUARTE et al., 2018).

As doenças causadas por *Staphylococcus aureus*, são decorrentes da invasão direta nos tecidos, ou seja, bacteremia primária devido as toxinas que a mesma produz. Elas se localizam em diversos sítios como foliculite, carbúnculo, antraz, furúnculo e diversos outros que causam um processo infeccioso ou não (TIWARI; SEN, 2006). As diferentes patologias contraídas por *Staphylococcus aureus*, fazem com que várias características patogênicas não sejam encontradas em cepas bacterianas do tipo gram positivo (CASSETARI; STRABELLI; MEDEIROS, 2005).

A capacidade de colonização e patogenicidade são decorrentes de três fatores: a) fatores relacionados com a aderência as células do hospedeiro ou a matriz extracelular, como a produção de moléculas de fibrinogênio, fibronectina, colágeno ou da enzima coagulase; b) fatores relacionados com a evasão da defesa do hospedeiro e c) fatores relacionados com a invasão na célula do hospedeiro e a penetração nos tecidos. E vários outros constituintes celulares, que podem induzir uma resposta imunológica ao hospedeiro (FERREIRA et al., 2009).

3.3.2 Tratamento e resistência de *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos

A propagação global de *Staphylococcus aureus* resistente à metilina (*methicillin-resistant Staphylococcus aureus* - MRSA) significa que se trata agora de um patógeno de interesse para a saúde pública mundial. E estes, surgiram nos anos 60 e se disseminou nos anos 80. Nos últimos quinze anos a MRSA se destacou por apresentar um dos patógenos mais frequentes em todas as partes do mundo, tornando um problema no ambiente hospitalar na atualidade (DUARTE, 2018).

O tratamento de pacientes com MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina) constitui hoje um problema de saúde, devido ao número menor de antimicrobianos disponíveis. Conhecer os padrões de resistência de *Staphylococcus aureus* em bacteremias, é necessária na prescrição empírica de antimicrobianos e na prevenção de eventos que possam favorecer a resistência bacteriana (PAMPLONA-ZOMENHAN, 2011).

A literatura evidencia que o tratamento deve ser orientado por fatores locais, incluindo as prováveis fontes de infecção e os fatores de risco associados com a população de pacientes ou o ambiente do paciente. Um diagnóstico microbiológico preciso e testes de sensibilidade facilitam a escolha da antibioticoterapia definitiva adequada. A disponibilidade de recursos, incluindo a disponibilidade de antibióticos e de testes microbiológicos, também é uma consideração importante (LUNA et al., 2010).

Atualmente a disponibilidade de antibióticos para o tratamento de MRSA compreende apenas um agente tópico e um número limitado de agentes orais, nos quais abrange os que são administrados por via intravenosa e por infusão intravenosa. A mupirocina corresponde aos agentes tópicos utilizado no tratamento do impetigo por *S. aureus* e *S. pyogenes*, mas também é comumente usada para tratar outras infecções de pele e partes moles, bem como em infecções de feridas cirúrgicas no pós-operatório. A mesma age inibindo a síntese de polimerase da proteína pela bactéria. Por outro lado, os agentes orais correspondem as tetraciclina e a rifampicina (em terapia de combinação), bem como a clindamicina, a linezolida e o sulfametoxazol-trimetoprim (ROBICSEK et al., 2009).

Clindamicina e linezolida estão disponíveis em apresentação oral e intravenosa. A clindamicina costuma ser escolhida como tratamento inicial ou definitivo para infecções de pele e partes moles adquiridas na comunidade por várias razões: apresenta 90% de biodisponibilidade após administração oral e penetra na pele e nas estruturas da pele; tem atividade apesar de uma elevada carga bacteriana no local da infecção; e pode inibir a produção de fatores de virulência no MRSA. (LUNA et al., 2010).

A vancomicina tem sido muito utilizada no tratamento de infecções por MRSA. Entretanto seu uso frequente resultou na baixa sensibilidade contra cepas de MRSA, mas ainda é considerada eficaz na maior parte do mundo (JONES, 2006).

A escolha inadequada de antibióticos está relacionada com a alta taxa de morbidade, mortalidade, custos e elevada frequência de bactérias multirresistentes associados a infecções, tornando se uma ameaça a sociedade (RODRIGUES, 2010). Evidenciando a necessidade de uma vigilância global mais rígida dos padrões de sensibilidade aos antimicrobianos.

O uso indiscriminado de antibióticos pode alterar a resistência das bactérias que causam doenças e tornar o medicamento ineficaz ao seu combate. Além de dificultar o tratamento, isso também pode afetar outras bactérias que ajudam o nosso organismo a funcionar corretamente.

De acordo com os estudos de Pamplona-Zomenhan et al (2011) o sinergismo *in vitro* entre própolis e drogas antimicrobianas foi investigado, e a formulação associada de própolis a antibióticos são de interesse médico potencial. Devido ao desenvolvimento de resistência a medicamentos por bactérias, esse sinergismo é evidente e mostra que a própolis pode ser uma opção viável de tratamento para esses patógenos. A combinação de própolis com agentes antimicrobianos permite doses menores do antibiótico incluído, além de potencializar a droga e, portanto, seu potencial médico, principalmente para uso tópico.

Gomes et al (2016), verificou a atividade antibacteriana *in vitro* da própolis vermelha, por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), e observou que o extrato alcoólico de própolis apresentou atividade antimicrobiana com CIM variando de 2,25 a 18,9 mg/mL para as bactérias Gram-positivas e 4,5 a 18,9 mg/mL para as bactérias Gram-negativas, e concluiu que a própolis vermelha tem ação bactericida, frente as espécies da bactéria em estudo.

A atividade antibacteriana da própolis pode estar relacionada diretamente à presença de compostos fenólicos e flavonoides, onde a maior concentração desses compostos bioativos determina uma maior atividade antibacteriana (CASTRO et al., 2007).

Com a diminuição do desenvolvimento de antimicrobianos, a indústria farmacêutica não consegue acompanhar a evolução da resistência bacteriana, e com isso as opções de tratamentos se tornam restritas. Portanto é necessário um estudo racional de antimicrobianos, diminuindo o risco de resistência bacteriana e novas estratégias de combate à evolução de organismos resistentes a antibióticos devem começar a funcionar, começando a nível municipal, com a informatização da população para o entendimento de como os antibióticos devem ser utilizados, elaboração de um plano de ação para que haja maior vigilância epidemiológica e recomendações para uma prática clínica mais elaborada. (FARIA, 2016).

4 MATERIAIS E METODOS

Trata-se de uma pesquisa experimental que assume caráter exploratório e descritivo, com abordagem quali-quantitativa e em escala de laboratório.

4.1 LOCAL DA PESQUISA

A pesquisa foi desenvolvida em parceria com o Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar, campus Pombal, PB e o Laboratório de Microbiologia e Parasitologia, do Centro de Formação de Professores (CFP), da Universidade Federal de Campina Grande, campus Cajazeiras, PB.

4.2 MATERIAIS

O extrato hidroalcoólico da Própolis Vermelha (Figura 3) utilizada neste experimento foi adquirida na cidade de João Pessoa-PB no Apiário EDIMEL. Possui uma mistura complexa, formada por material resinoso e balsâmico. Sua composição química é complexa e variada, inclui flavonóides, ácidos aromáticos, terpenóides e fenilpropanóides, ácidos graxos e vários outros compostos.

Figura 3: Extrato hidroalcoólico da própolis vermelha



Fonte: Próprio Autor.

Já as cepas do gênero *Staphylococcus aureus* utilizada na pesquisa foram obtidas por doação do Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde da Fundação Oswaldo Cruz, onde as mesmas fazem parte da Coleção de Microrganismos de Referência em Vigilância Sanitária. Os estoques de culturas foram mantidos em Brain Heart Infusion Broth (BHI) e armazenados em refrigerador. Os dados sobre cada espécime da pesquisa estão expostos no Quadro 1.

Quadro 1 Informações sobre as leveduras do gênero S utilizadas na pesquisa de acordo com INCQS/CMRVS/FIOCRUZ

Nº de acesso no INCQS*	Nº de acesso na ATCC^	Microrganismo	Fonte de isolamento
INCQS 00402	ATCC 6538	<i>Staphylococcus aureus</i>	Lesão Humana
INCQS 00188	ATCC	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
INCQS 00186	ATCC	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
INCQS 00187	ATCC	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
INCQS 00189	ATCC	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
INCQS 00192	ATCC	<i>Staphylococcus aureus</i>	-
INCQS 00193	ATCC	<i>Staphylococcus aureus</i>	-

Fonte: Elaborado pelo autor com dados extraídos do INCQS/CMRVS/FIOCRUZ (2019). *Número de identificação da cepa no Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde; ^ Número de identificação da cepa no American Type Culture Collection.

Para avaliar a atividade moduladora da ação antibiótica do extrato da própolis vermelha foram utilizados os seguintes antibióticos, ciprofloxacino e benzetacil, adquiridas em Farmácia comercial da cidade de Pombal/PB.

4.3 ATIVIDADE CONTRA BACTÉRIAS

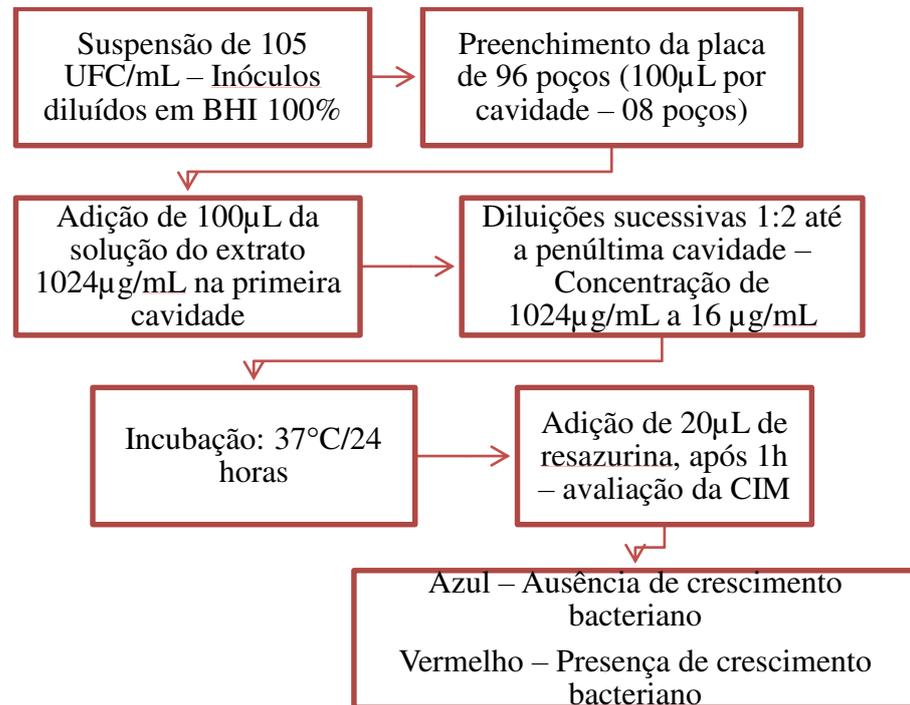
4.3.1 Concentração Inibitória Mínima – CIM

A concentração inibitória mínima (CIM $\mu\text{g/mL}$) foi determinada em caldo *Brain Heart Infusion* (BHI 100%) pelo método de microdiluição, usando uma suspensão de 10⁵ (Unidade Formadora de Colônia) UFC/mL (para escala de Mcfarland 0,5) e uma concentração do extrato da própolis vermelha de 1024 $\mu\text{g/mL}$ diluída sequencialmente pelo título 1:2 (JAVADPOUR et al., 1996).

Seguindo os ensaios, foi preparado o meio de distribuição em tubos estéreis utilizando 100 μL do inóculo em 900 μL do meio de cultura líquido BHI. Posteriormente o conteúdo do tubo foi transferido para placa de microdiluição de 96 poços, em sentido horizontal, utilizando 100 μL em cada poço, perfazendo 09 poços. Em sentido vertical foi utilizado 100 μL em cada poço, perfazendo 08 poços. Após essa etapa, foi realizada a microdiluição das substâncias (extrato de própolis e antibióticos) sendo 100 μL nesse meio até penúltima cavidade (1:1). Na última cavidade não foi adicionada por ser o controle de crescimento.

As concentrações variaram de 1024 $\mu\text{g/mL}$ a 16 $\mu\text{g/mL}$. As placas foram incubadas em estufa de crescimento a 37° por 24h. Após o período de incubação é feita a leitura das placas por visualização de mudança de cor do meio caracterizado pela adição de 20 μL de resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona 10-óxido). A leitura desse experimento teve como característica, a mudança de cor do meio de azul para vermelho indicando a presença de crescimento bacteriano e a permanência em azul, a ausência de crescimento (Figura 4).

A CIM foi definida como a menor concentração de crescimento bacteriano observado, e serviu para a avaliação das substâncias como moduladoras da resistência aos antibióticos, a concentração subinibitória foi determinada pelo CIM/8 para *Staphylococcus aureus*. Os testes serão realizados em triplicata (Tabela 1).

Figura 4- Fluxograma da Concentração Inibitória Mínima

Fonte: Própria Pesquisa.

Tabela 1: Determinação da concentração inibitória mínima ($\mu\text{g/mL}$) do extrato de própolis vermelha

Benzetacil				Ciprofloxacino				Amostra		
1024	1024	1024		1024	1024	1024		1024	1024	1024
512	512	512		512	512	512		512	512	512
256	256	256		256	256	256		256	256	256
128	128	128		128	128	128		128	128	128
64	64	64		64	64	64		64	64	64
32	32	32		32	32	32		32	32	32
16	16	16		16	16	16		16	16	16
CN	CN	CN		CN	CN	CN		CN	CN	CN

Fonte: Própria Pesquisa

4.3.2 Modulação

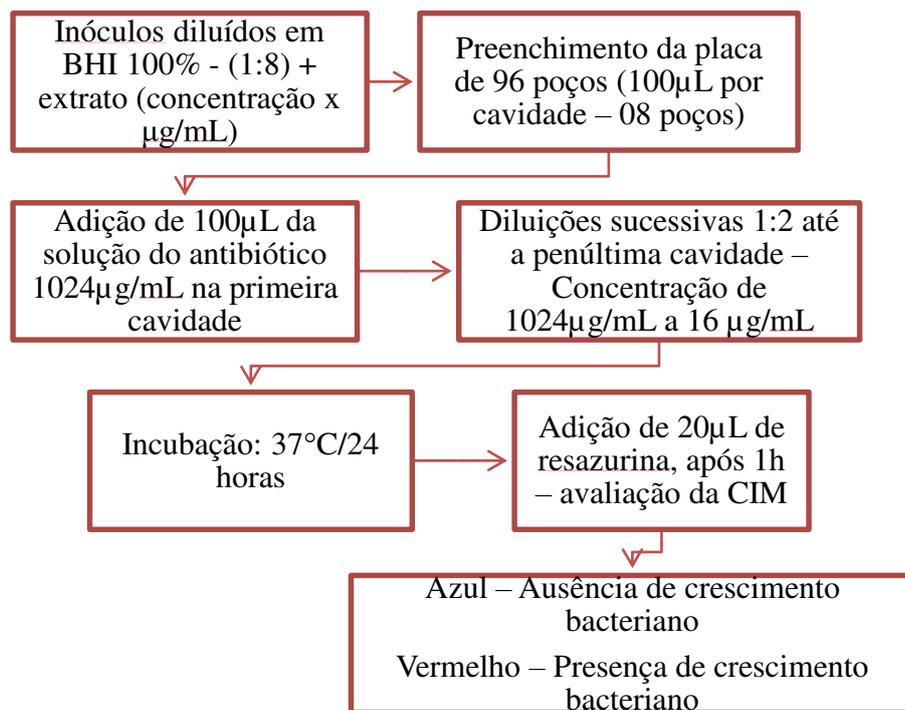
Para avaliar a atividade moduladora da ação de antibióticos os testes foram realizados em triplicata. Cada poço da placa de microdiluição continha o extrato da própolis vermelha em concentração subinibitória de forma constante e os antibióticos em concentrações

decrecentes, partindo de 1024 μ g/mL, diluídas sequencialmente 1:2 até 16 μ g/mL, sendo misturadas em caldo BHI 100%, este preparado com água destilada estéril.

Em cada poço foi adicionado 100 μ L de caldo BHI 100% como 64 μ g/mL do extrato da própolis vermelha que foi definida pelo CIM analisado com antecedência e inóculo bacteriano (105 UFC/mL). Tais quantidades foram determinadas pela fórmula de concentração.

No primeiro poço foi adicionado 100 μ L de uma solução do antibiótico com 1024 μ g/mL, procedendo a diluição sequencial com título 1:2 nos poços seguintes. As placas foram incubadas a 37°C e lidas depois de 24h, com revelação pela resazurina como descrito na determinação do CIM (figura 5).

Figura 5: Fluxograma da atividade moduladora



Fonte: Própria Pesquisa

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os resultados da determinação da concentração inibitória mínima do extrato da própolis vermelha, revelaram um valor da CIM = 512 µg/mL (Figura 6.A) para a bactéria testada, indicando haver atividade antibacteriana clinicamente relevante, de forma isolada. Pois o sinergismo se dá nas concentrações abaixo de 1024 µg/ML e este resultado se torna satisfatório frente a bactéria testada. Observa-se que nos poços identificados em ordem decrescente: 1) 1024, 2) 512, 3) 256, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16 e 8) CONTROLE NEGATIVO, a coloração foi considerada como azul, a olho nu, indicando ausência de crescimento bacteriano a partir do 2º poço, ou seja no poço de concentração 512 µg/mL em diante, observou sinergismo do mesmo.

Bispo-Junior et al. (2012) e Lopez et al. (2011), quando analisaram a CIM de própolis vermelhas dos estados de Alagoas, Sergipe e Paraíba, revelaram que as amostras da própolis vermelha mostraram valores de CIM de 512µg /mL frente as linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* testadas. E apresentaram como uma potente atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Streptococcus mutans* (UA 159).

Em relação aos antibióticos testados, observa-se atividade antibacteriana da Benzetacil (Figura 6.B) em todas as concentrações, na qual a coloração visualizada foi azul em todos os poços em ordem decrescente: 1) 1024, 2) 512, 3) 256, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16 e 8) CONTROLE NEGATIVO, indicando ausência de crescimento bacteriano do referido antibiótico, o mesmo se tornou satisfatório em todas as concentrações. No antibiótico Ciprofloxacino (Figura 6.C), não houve atividade antibacteriana crescente e nem decrescente em todos os poços, considerando um efeito Nulo, por indicar mudanças de coloração insatisfatória na triplicata. E isto se deve a pouca atividade do Ciprofloxacino para bactérias Gram +, por ser uma cepa originada de outros sítios anatômicos. E este grupo pertence ao tratamento de infecções por bactérias multirresistentes, particularmente no trato urinário.

De acordo com os estudos de Coutinho et al. (2015), a Claritromicina, quando usada como agente modulador do Ciprofloxacino, revelaram que não houve significância da droga frente as cepas de *Staphylococcus aureus*. Porém, houve sinergismo aumentado frente a linhagem bacteriana de *Escherichia coli*, com uma redução de 16 µg/mL, quando isolado, para 3 µg/mL, em associação. Mas, quando o Ciprofloxacino modula a Claritromicina, foi constatado um efeito sinérgico significativo frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Figura 6: Placa de Microdiluição avaliada na CIM



Fonte: Própria Pesquisa

Outros estudos realizados anteriormente, revelaram que a própolis vermelha, possui um alto teor de compostos fenólicos, principalmente os flavonoides, estes compostos estão associados à atividade antibacteriana (FREIRES; ALENCAR; ROSALEM, 2016).

Segundo, os estudos de Maia Araújo et al. (2011), o extrato hidroalcoólico da própolis vermelha revelou atividade antibacteriana em diferentes concentrações, frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, tanto na técnica de microdiluição no poço, como a difusão de disco. Dando maior ênfase na técnica de microdiluição com concentrações bem menores.

A variação das propriedades químicas da própolis vermelha, de acordo com a sazonalidade, chuvas, climas, estiagens e entres outros, é um fator determinante por apresentar valores de CIM entre 64 e 1024 μ g/mL contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, pelo método de microdiluição em poços (REGUEIRA NETO et al., 2017).

As pesquisas acima afirmam que o extrato hidroalcoólico da própolis vermelha possui atividade antibacteriana contra vários microorganismos. Na qual é idêntica aos resultados desta pesquisa, indicando atividade antibacteriana do extrato sobre *Staphylococcus aureus*.

Anteriormente, houve várias buscas científicas em pesquisas farmacológicas sobre as propriedades biológicas em plantas medicinais. Outra alternativa para os tratamentos, se diz respeito a associação de antimicrobianos, para se obter uma ação sinérgica frente aos microorganismos (ANVISA, 2013).

Um estudo contendo extrato etanólico da Entrecasca de *Libidibia férrea*, foi observado sinergismo com a Amicacina e Gentamicina contra cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Assim como foi detectado sinergismo entre o produto natural e Amicacina frente a *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (FERREIRA et al., 2016)

Segundo, Tintino et al. (2013), os extratos etanólico e hexânico não revelaram atividade antibacteriana contra as cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (CIM \geq 1024 $\mu\text{g/mL}$). Entretanto, quando foram associados com os antibióticos Gentamicina, Amicacina e Neomicina, tanto o extrato etanólico e hexânico foram eficazes contra *Staphylococcus aureus* (SARASWATHI et al., 2010).

Os dados verificados poderão incentivar pesquisas futuras sobre os aspectos antimicrobianos de produtos naturais de isolados de Própolis vermelha. O intuito é fundamentar sua possível utilização como agente modificador da resistência de microorganismos; que mostraram eficazes contra cepas bacterianas responsáveis pelo aumento da morbidade da população. A pesquisa por moduladores de resistência de origem natural representa um marco importante na dimensão da problemática da resistência microbiana (JOUNG et al., 2012; LACERDA NETO, 2010).

5.2 Modulação

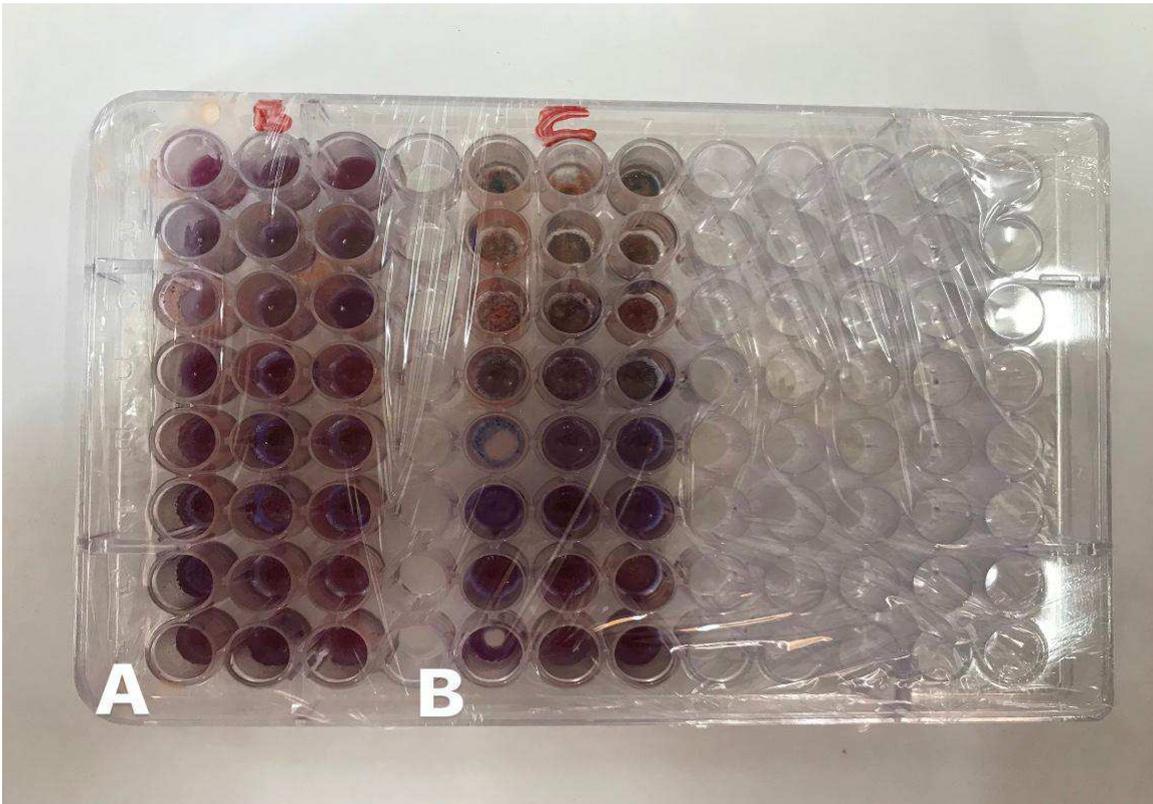
O teste de modulação objetiva verificar a influência da concentração subinibitória do extrato da própolis vermelha sobre a ação de diversas concentrações de antibióticos frente a cepas bacterianas em estudo. Os resultados do teste da modulação demonstraram que quando o Benzetacil (Figura 7.A), associados à concentração subinibitória (CIM/8), não houve crescimento frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, evidenciado pela coloração azul até a concentração de 32 $\mu\text{g/mL}$, (1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32 após isso observa uma coloração avermelhada no fundo do poço. O resultado foi quase idêntico à ação dos antibióticos testado isoladamente, a qual a redução foi satisfatória frente a bactéria testada. Devido o antibiótico bactericida atuarem inibindo a síntese da parede celular bacteriana, interferindo na transpeptidação, tanto de bactérias gram-positivas quanto de gram-negativas.

O antibiótico Ciprofloxacino (Figura 7.B), associado a concentração subinibitória do extrato da própolis vermelha, não apresentaram crescimento e/ou inibição se tornando sem efeito, (1) 1024, 2) 512, 3) 258, 4) 128, 5) 64, 6) 32, 7) 16 e 8) CONTROLE NEGATIVO quando comparado aos antibióticos testados isoladamente na CIM. O efeito nulo frente a este medicamento, foi observada em todos os poços de diferentes concentrações, através de mudança de coloração na triplicata, tornando a mesma sem efeito. Isto se deve ao fato de os receptores de ligação da própolis ser o mesmo do medicamento testado, na célula alvo do *Staphylococcus aureus*, por isso foi o mesmo efeito.

O aumento da prescrição de ciprofloxacina para infecções do trato urinário se associou de maneira significativa ao aumento da resistência dos uropatógenos a norfloxacina,

independente de outros fatores como a idade e o sexo (CAMPOS; OTEO, 2004). Essas altas taxas de prescrição geram o conseqüente aumento da resistência às fluoroquinolonas e fracassos terapêuticos com relação a estes antibióticos. O papel do uso prévio de quinolônicos e de certas peculiaridades da bactéria infectante no aumento da resistência a ciprofloxacina deve ser visto como uma importante questão a ser observada e estudada em pesquisas futuras (CAMPOS; OTEO, 2004; TAVARES, 2009). Ao avaliar a evolução temporal da resistência bacteriana a ciprofloxacina, não se observa um aumento estatisticamente significativo em relação a este antibiótico.

Figura 7: Placa avaliada no processo de Modulação



Fonte: Pesquisa Própria

6 CONCLUSÃO

O extrato hidroalcoólico da própolis vermelha possui atividade antibacteriana sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, indicando um valor de CIM = 512µg/mL, indicando sinergismo satisfatório do mesmo, abaixo de 1024µg/mL. Houve ação antibacteriana na concentração inibitória da própolis vermelha associada ao Benzetacil, por serem sensível a algumas classes de bactérias gram + e efeito nulo para Ciprofloxacino frente as cepas de *Staphylococcus aureus*, por ter pouca atividade para bactérias gram +. Na avaliação da atividade modulatória, foi observada ação antibacteriana satisfatória do extrato da própolis vermelha em associação com Benzetacil; e em associação com Ciprofloxacino não houve efeito sobre cepas de *Staphylococcus aureus*, pois tanto a Própolis como o medicamento possuem os mesmos receptores de ligação, tornando o mesmo efeito. A própolis vermelha é mais eficaz e rentável, do que em associação com antibióticos, e isto pode estar relacionado ao composto químico da própolis e a forma de como ela é extraída e utilizada em sua padronização. Contribuindo positivamente para assegurar melhores resultados e haver o controle e/ou diminuição e custos no tratamento de infecções por *Staphylococcus aureus*.

Observou-se que a associação entre antibióticos demonstrou efeitos sinérgicos e consequentemente diminuição da resistência microbiana. Tal evento, possivelmente, deve-se ao fato de alguns dos antibióticos agirem em alvos diferentes, melhorando a capacidade antibacteriana. Porém a literatura carece de informações adicionais acerca de tal prática, o que reforça a necessidade de mais estudos como este para subsidiar o uso de antibióticos e analisar futuramente seus efeitos como alternativa para diminuir o alto índice de resistência aos antibióticos atualmente comercializados.

Diante do exposto, é necessária a conscientização urgente da comunidade e da classe médica quanto aos perigos do uso irracional de antimicrobianos. A prescrição e utilização dos medicamentos sem o conhecimento do perfil de sensibilidade antimicrobiana da bactéria causadora da infecção pode significar um aumento de cepas resistentes a drogas com menor espectro de ação, menores custos e posologia relativamente confortável para o paciente.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, S M; OLDONI, T L C; CASTRO, M L; CABRAL, I S R; COSTA-NETO, C M; CURY, J A; ROSALEN P L; IKEGAKI, M. Chemical composition and biological activity of a new type of Brazilian propolis: Red propolis. **J Ethnopharmacol**, v.113, p.278-83, 2007.

ANAUATE NETTO, C. et al. Effects of typified propolis on mutans streptococci and lactobacilli: a randomized clinical trial. **Brazilian Dental Science**, v.16, n.2, p. 31-36, 2013. Disponível em: < <http://ojs.ict.unesp.br/index.php/cob/article/view/879/802>>. Acesso em 10 agosto 2016.

ANDRADE, J. K. S. et al. Evaluation of bioactive compounds potential and antioxidant activity of brown, green and red propolis from Brazilian northeast region. **Food Research International**. V.101, p.129-138, 2017.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - Nota Técnica N.º 1/2013 - Medidas de prevenção e controle de infecções por enterobactérias multiresistentes. **Brasília: anvisa**; 2013.

ARAÚJO, K. C. S.; MARCUCCI, M. C. Efeito sinérgico da própolis tipificada contra *Enterococcus faecalis*. **Revista de pesquisa e inovação farmacêutica**, v.3, n.1, p. 9 – 14, 2011.

BEZERRA, A. M. F. et al. Action of Propolis on Microorganisms of the Oral Cavity: an Integrative Review. **International Archives of Medicine**. v. 08, n.118, p. 1-13, 2015.

BEZERRA, K. K. S. et al. Vaginal Yeasts and the Antifungal Action of Red Propolis Extract. **International Archives of Medicine**, v. 8, n. 154, 2015.

BITTENCOURT, F. O.; PADILHA, F. F.; SIQUEIRA, A. L.; DANTAS, C. G.; MENDONÇA, L. S.; ARAÚJO, Y. L. F. M; ARAÚJO, E. D.; CARDOSO, J. C. Avaliação da atividade antifúngica de formulações semisólidas contendo extrato hidroalcoólico de própolis vermelha. **Scientia Plena**, v.10, p.104-501, 2014.

BISPO JUNIOR, W. et al. Atividade antimicrobiana de frações da própolis vermelha de Alagoas. **Ciências Biológicas e da Saúde**. Londrina, v. 33, n. 1, p. 03-10, 2012.

BUENO-SILVA, B; FRANCHIN, M.; ALVES, C. de F.; DENNY, C.; COLON, D. F.; CUNHA, T. M.; ALENCAR, S. M.; NAPIMOGA, M. H.; ROSALEN, P. L. Main pathways of action of Brazilian red propolis on the modulation of neutrophils migration in the inflammatory processo. **Phytomedicine**, v.23, n° 13, p. 1583-1590, 2016.

CABRAL, Y. S. R. et al. Composição fenólica, atividade antibacteriana e antioxidante da própolis vermelha brasileira. **Quim. Nova**. v. 32, n. 6, p.1523-7, 2009.

CAMPOS, J.; OTEO J. Uso de quinolonas y resistência. *Enfermedades Infecciosas y Microbiologia Clínica*,v.22, n.4, p.201-203, 2004.

CASSETTARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. Staphylococcus aureus bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality ? **Braz J Infect Dis**, v. 9, n. 1, p. 70-6, 2005

CASTRO, M. L.; CURY, J. A.; ROSALEN, P. L.; ALENCAR, S. M; IKEGAKI, M.; DUARTE, S.; KOO, H. Própolis do Sudeste e Nordeste do Brasil: Influência da Sazonalidade na Atividade Antibacteriana e Composição Fenólica. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 7, p. 1512-1516, 2007.

CARVALHO, C. et al. Monitoramento microbiológico seqüencial da secreção traqueal em pacientes intubados internados em unidade de terapia intensiva pediátrica. **J Pediatr**, v. 81, n. 1, p. 29-33, 2005.

CAVALCANTI, Veraluce Paolini et al . Staphylococcus aureus in tonsils of patients with recurrent tonsillitis: prevalence, susceptibility profile, and genotypic characterization. **Braz J Infect Dis**, Salvador , v. 23, n. 1, p. 8-14, Jan. 2019.

COUTINHO, H. D. M; BRITO, S. M. O; LEITE, N. F; VANDESMET, V. C. S; OLIVEIRA, M. T. A; MARTINS, G. M. A. B; et al. Avaliação comparativa da modulação de antibióticos, frente às cepas bacterianas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*. **Rev Cienc Salud**. 2015;13(3):345-354. doi: dx.doi.org/10.12804/revsalud13.03.2015.02

DAUGSCH, A. **A própolis vermelha do nordeste do Brasil e suas características químicas e biológicas**. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas- Faculdade de Engenharia de Alimentos, São Paulo, 2007.

DAUGSCH, A.; MORAES C. S.; FORT, P.; PARK. Y. K. Brazilian red propolis – chemical composition and botanical origin. **eCAM**. V.5, n.4, p.435-441, 2008.

DUARTE, Felipe Crepaldi et al. Bacteremia causada por Staphylococcus aureus: Uma análise de quinze anos da sensibilidade a antimicrobianos em um hospital terciário do Brasil.. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Santa Cruz do Sul, v. 8, n. 3, jul. 2018.

FARIA T. V., PESSALACIA J. D. R., SILVA E. S. Fatores de risco no uso de antimicrobianos em uma instituição hospitalar: reflexões bioéticas. **Acta Bioethica**, v.22, n.2, p.321-329, 2016.

FERREIRA, W .; Vasconcelos, W .; FERREIRA, C .; SILVA, M .; GOMES, J .; ALECRIM, M. Prevalência de Staphylococcus aureus resistente à meticilina (MRSA) em pacientes atendidos em um Ambulatório Geral de Dermatologia em Manaus, Estado da Amazônia, Brasil. **Revista de Patologia Tropical / Revista de Patologia Tropical** , v. 38, n. 2, p. 83-92, 7 de julho de 2009.

FERREIRA, J.V.A; LIMA, L.F; FIGUEIREDO, F.G; MATIAS, E.F.F; SOUZA, E.S; ANDRADE, J.C; TINTINO, S.R; LEITE, N.F; ALBUQUERQUE, R.S; BRAGA, M.F.B.M; CUNHA, F.A.B; MARTINS, J.G.C; COUTINHO, H.D.M; Avaliação da atividade antimicrobiana e moduladora do extrato etanólico de *Libidibia ferrea* (Mart. ex Tul.) L.P. Queiroz. **Rev Cubana Plant Med**, Ciudad de la Habana , v. 21, n. 1, p. 71-82, março 2016.

FERREIRA, V. U. **Caracterização química, atividades antioxidante, antileucêmica e antimicrobiana da própolis âmbar sul brasileira**. 2017. 68p. Dissertação. Mestrado em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pampa, São Gabriel, RS.

FREIRES, I. A.; QUEIROZ, V. C. P. P.; FURLETTI, V. F.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S. M DE; DUARTE, M. C. T.; ROSALEN, P. L. Chemical composition and antifungal potential of Brazilian propolis against *Candida* spp. **Journal de Mycologie Médicale**, v.26, p.122-132, 2016.

FREIRES, I. A.; ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. A pharmacological perspective on the use of Brazilian Red Propolis and its isolated compounds against human diseases. *European Journal Of Medicinal Chemistry*, [s.l.]. **Elsevier BV**. v. 110, p.267-279, 2016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejmech.2016.01.033>.

FROZZA, C. O. S. et al. Chemical characterization, antioxidant and cytotoxic activities of Brazilian red propolis. *Food And Chemical Toxicology*, [s.l.]. **Elsevier BV**. v. 52, p.137-142, fev. 2013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2012.11.013>.

GOMES, M. F. F.; ÍTAVO, C. C. B. F.; LEAL, C. R. B.; ÍTAVO, L. C. V; LUNAS, R. C. Atividade antibacteriana in vitro da própolis preta. **Pesq. Vet. Bras.**, v. 36, n.4, p. 279-282, 2016.

JAVADPOUR, M. M. et al. De novo antimicrobial peptides with low mammalian cell toxicity. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 39, n. 16, p. 3107-3113, 1996.

JONES. R. N. Microbiological features of vancomycin in the 21st century: minimum inhibitory concentration creep, bactericidal/ static activity, and applied breakpoints to predict clinical outcomes or detect resistant strains. **Clin Infect Dis**. 2006; 42(Suppl 1):S13-24.

JOUNG, D. K. et al. Antibacterial and synergistic effects of *Kochia scoparia* extracts against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **African Journal of Microbiology Research**. v. 6, n. 10, p. 2449-2454, 2012.

KONEMAN, E. et al. **Diagnóstico microbiológico**. 5 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. cap. 11, parte 1.

LACERDA NETO, L. J. Avaliação da atividade antibacteriana e gastroprotetora do extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar coriaceum* WITTM. **Dissertação de Mestrado**. URCA. Ce. 2010.

LOPES, B.G.C. et al. Antimicrobial and cytotoxic activity of red propolis: an alert for its safe use. **Journal of Applied Microbiology**. v. 119, n. 3, p.677-687, 2 ago. 2015. Wiley-Blackwell. <http://dx.doi.org/10.1111/jam.12874>.

LOPEZ, A.M.Q, et al. “**Normas de produção da Própolis Vermelha de Alagoas**”, Mimeo, Documento enviado ao INPI para solicitação da Indicação Geográfica, modalidade Denominação de Origem - Mista, Maceió, 2011.

LUNA, Carlos M et al . Tratamento de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina na América Latina. **Braz J Infect Dis**, Salvador , v. 14, supl. 2, p. 119-127, Dec. 2010 .

- LUPION, G. C. A.; CAMACHO, D. P.; NEGRI, M. Avaliação in vitro do extrato da própolis como possível fonte de tratamento para Candidíase Vulvovaginal. **Braz. J. Surg. Clin. Res.** v. 4, n. 2, p.11-16, set – nov, 2013.
- LUSTOSA, Sarah R. et al . Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Rev. bras. farmacogn.**, João Pessoa , v. 18, n. 3, p. 447-454, Sept. 2008.
- MAIA ARAÚJO, Y. L. F. et al. Comparação entre duas técnicas utilizadas no teste de sensibilidade antibacteriana do extrato hidroalcolólico de própolis vermelha. **Scientia plena**, v.7, n. 4, 2011.
- NUNES, L. C. C. et al. Variabilidade sazonal dos constituintes da própolis vermelha e bioatividade em *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, 2009.
- OLDONI, T. L.C.; CABRAL, I.C.R.; D'ARCEA, M.A.B.R.; ROSALEN, P.L.; IKEGAKIC, M.; NASCIMENTO, A.M.; ALENCAR, S.M. Isolation and analysis of bioactive isoflavonoids and chalcone from a new type of Brazilian propolis. **Separation and Purification Technology**, v.77, p. 208–213, 2011.
- PAMPLONA-ZOMENHAN, Lucila Coelho et al . Evaluation of the in vitro antimicrobial activity of an ethanol extract of Brazilian classified propolis on strains of *Staphylococcus aureus*. **Braz. J. Microbiol.**, São Paulo , v. 42, n. 4, p. 1259-1264, Dec. 2011 .
- PETER, Cristina Mendes et al . Atividade antiviral e virucida de extratos hidroalcolólicos de própolis marrom, verde e de abelhas Jataí (*Tetragonisca angustula*) frente ao herpesvírus bovino tipo 1 (BoHV-1) e ao vírus da diarreia viral bovina (BVDV). **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro , v. 37, n. 7, p. 667-675, jul. 2017.
- REGUEIRA NETO, M. S. et al. Seasonal variation of Brazilian red propolis: Antibacterial activity, synergistic effect and phytochemical screening. **Elsevier**. 2017.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.fct.2017.03.052>.
- ROBERTO, M. M.; MATSUMOTO, S. T.; JAMAL, C. M.; MALASPINA, O.; MARIN-MORALES, M. A. Evaluation of the genotoxicity/mutagenicity and antigenotoxicity/antimutagenicity induced by propolis and *Baccharis dracunculifolia*, by in vitro study with HTC cells. **Toxicology in Vitro**, v.33, p. 9-15, 2016.
- ROBICSEK. A. MD.; BEAUMONT J. L.; THOMSON RB. JR.; GOVINDARAJAN. G.; PETERSON. L. R. Topical therapy for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* colonization: impact on infection risk. **Infect Control Hosp Epidemiol**. 2009; 30(7):623-32.
- RODRIGUES, F.A.; BERTOLDI, A.D. Perfil da utilização de antimicrobianos em um hospital privado. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v.15, supl.1, p.1239-1247, 2010.
- RODRIGUES, M. S. A. **Biofilme a base de extrato de própolis vermelha e seu efeito na conservação pós-colheita de tomate tipo italiano**. 2015. 82p. Dissertação (Mestrado em Sistemas Agroindustriais), Universidade Federal de Campina Grande, Centro de Ciências e Tecnologia Agroalimentar , Pombal, PB, 2015.

SANTOS, Y.T.O. **Qualidade sanitária de hortaliças cultivadas em um distrito sanitário de Salvador-BA e eficiência de soluções antimicrobianas sobre linhagens de Escherichia coli.** [Dissertação]. Salvador: Universidade Federal da Bahia; 2007.

SANTOS, André Luis dos et al . Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro , v. 43, n. 6, p. 413-423, Dec. 2007

SANTOS, Darlan C. dos; DAVID, Jorge Mauricio; DAVID, Juceni Pereira. Composição química, atividade citotóxica e antioxidante de um tipo de própolis da Bahia. **Quím. Nova**, São Paulo , v. 40, n. 2, p. 171-175, Feb. 2017.

SARASWATHI, R.; UPADHYAY, L.; VENKATAKRISHNAN, R.; MEERA, R.; DEVI, P. Isolation and biological evaluation of steroid from stem of *Costus igneus*. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**. Londres, Nova York, v. 2, n. 5, p. 444-448. Fev. 2010.

SFORCIN, J. M; BANKOVA, V. Propolis: Is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, p. 253–260, 2011.

SILVA, B. B.; KAWAMOTO, D. et al. Brazilian red propolis effects on peritoneal macrophage activity: Nitric oxide, cell viability, pro-inflammatory cytokines and gene expression. **Journal of Ethnopharmacology**. v.207, p. 100-107, 2017.

SIQUEIRA, A. L. et al. Estudo da ação antibacteriana do extrato hidroalcoólico de própolis vermelha sobre *Enterococcus faecalis*. **Revista de Odontologia da Unesp**. V.43, n.6, p.359-366, 2014.

SOUZA, F. B. R.; FISCHER, G.; VARGAS, G. D. Efeito antimicrobiano da própolis contra agentes infecciosos de interesse veterinário. **Science and animal health**. v.1, n.1, p.24-37, 2013.

TAVARES, W. Antibióticos e quimioterápicos para o clínico, 2.ed. São Paulo: Ateneu, 2009

TINTINO, S.R; GUEDES, G.M.M; CUNHA, F.A.B; SANTOS, K.K.A.D; MATIAS, E.F.F; MORAIS-BRAGA, M.F.B; ANDRADE, J. C; SOUZA, E.S; FREITAS, M.A; ALENCAR, L.B.B; COSTA, J.G.M; COUTINHO, H.D.M. AVALIAÇÃO *in vitro* DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E MODULADORA DOS EXTRATOS ETANÓLICO E HEXÂNICO DE BULBO DE *Costus arabicus*. **Biosci. J.**, Uberlândia, v. 29, n. 3, p. 732-738, May/June 2013.

TIWARI, H. K.; SEN, M. R. Emergence of vancomycin resistant *Staphylococcus aureus* (VRSA) from a tertiary care hospital from northern part of India. **BMC Infect Dis**, v. 6, n. 156, 2006.