

**LUCILA COELHO PAMPLONA ZOMENHAN**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRATO  
ETANÓLICO DE PRÓPOLIS TIPIFICADA FRENTE A CEPAS DE  
*Staphylococcus aureus***

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa  
de São Paulo para obtenção do título de Mestre  
em Ciências da Saúde.

**São Paulo**

**2009**

# **Livros Grátis**

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

**LUCILA COELHO PAMPLONA ZOMENHAN**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DE EXTRATO  
ETANÓLICO DE PRÓPOLIS TIPIFICADA FRENTE A CEPAS DE  
*Staphylococcus aureus***

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação da  
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa  
de São Paulo para obtenção do título de Mestre  
em Ciências da Saúde.

**Área de Concentração:** Ciências da Saúde

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Lycia Mara Jenné Mimica

**São Paulo**

**2009**

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**Preparada pela Biblioteca Central da**  
**Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**

Zomenhan, Lucila Coelho Pamplona

Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato etanólico de propólis tipificada frente a cepas de *Staphylococcus aureus.*/ Lucila Coelho Pamplona Zomenhan. São Paulo, 2009.

Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo – Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Ciências da Saúde

Orientador: Lycia Mara Jenné Mimica

1. Própolis 2. *Staphylococcus aureus* 3. Produtos com ação antimicrobiana

BC-FCMSCSP/55-09

Ao Fernando por todo o amor e carinho de sempre e à Beatriz, nossa filha, por toda a alegria que já tem nos dado.

E aos meus pais e irmãos por todos os exemplos e ensinamentos de vida.

## **Agradecimentos**

À Prof. Dra. Lycia Mimica pela orientação e incentivos durante a realização deste trabalho.

Ao Dr. Amadeu Amaral por acreditar no meu sonho e promover o encontro entre orientadora e orientada.

À amiga Cely Barreto da Silva por acompanhar e participar de todo este trabalho, principalmente, na parte experimental.

Ao Dr. Igor Mimica por contagiar a todos a sua volta pela paixão por Microbiologia.

Ao Dr. Waldemar Francisco, Dra. Beatriz Pamplona, Dra. Maria Cristina Marcucci Ribeiro e Dra. Suely Ueda pela participação na banca da qualificação e contribuição neste trabalho.

À Probac do Brasil pelo fornecimento de insumos, a possibilidade de preparo dos meios de cultura e total apoio para a conclusão deste trabalho. E aos amigos da Probac: Magaly, Carlos Henrique, Rosana, Claudinei, Ione e Jeice pela ajuda e acompanhamento diário.

À Maria Aparecida Silva Gennare pela atenção e preparo dos materiais utilizados.

À Célia Otsuka Takiy por toda a boa vontade no auxílio e preparo dos meios de cultura em placas.

À Sumiko Ikura Sinto pela ajuda na execução das interpretações de cepas utilizadas no trabalho.

À Alessandra Navarini e Rozane Carvalho pelos fornecimentos das cepas.

Ao Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo por garantir a execução deste trabalho.

À amiga e companheira Sula por toda a paciência em me escutar e pelas orientações sempre prestadas.

À Secretaria Geral do curso de pós-graduação e aos secretários do curso de Ciências da Saúde: Mirtez Dias Souza, Rita de Cássia Santos Oliveira e Daniel Gomes por todas as orientações e atendimentos sempre gentis.

Ao Prof. Dr. Jorge Mancini Filho e Prof. Dra. Ligia Bicudo Almeida Muradian por todos os ensinamentos e acompanhamentos de projetos de Iniciação Científica.

À Novo Mel, tia Beatriz e aos primos Carlos e Roberto Pamplona Rehder pelo fornecimento das amostras de própolis, incentivos e conhecimentos compartilhados.

À Prof. Dra Maria Cristina Marcucci Ribeiro pela possibilidade de execução das análises cromatográficas das amostras em seu laboratório.

À Equipe da Biblioteca da Faculdade pelos atendimentos rápidos e eficazes.

Ao Dr. Stanley e toda a equipe de Microbiologia do Laboratório Central da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo pela seleção e fornecimento de cepas de *S. aureus*.

À Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e a Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo pela oportunidade de realização deste estudo e incentivo à pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro para a realização deste trabalho.

## Lista de Abreviaturas

**ANVISA:** Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ATCC:** *American Type Culture Collection*

**CDC:** *Center for Disease Control and Prevention*

**CFTR:** *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulation*

**CIM:** Concentração Inibitória Mínima

**CLSI:** *Clinical and Laboratory Standards Institute*

**EEP:** Extrato etanólico de própolis

**FCMSCSP:** Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

**GL:** Gay Lussac

**HIV:** *Human Immunodeficiency Virus*

**I:** Intermediária

**ISCMSp:** Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo

**m:** Massa

**mg:** Miligrama ( $10^{-3}$ g)

**MRSA:** *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à metilina)



**MSSA:** *Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* sensível à meticilina)

**NOEL:** *Non-observed effect level*

**ORSA:** *Oxacillin-resistant Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* resistente à oxacilina)

**PBP2a:** *Penicillin binding proteins 2a*

**R:** Resistente

**S:** Sensível

***S. aureus:*** *Staphylococcus aureus*

**UFC:** Unidade Formadora de Colônias

**V:** Volume

**VISA:** *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus* com susceptibilidade reduzida à vancomicina)

**µg:** Micrograma ( $10^{-6}$ g)

## Sumário

1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Revisão da Literatura	6
1.1.1 Própolis	6
1.1.2 Toxicidade da Própolis	12
1.1.3 Aplicação em Queimaduras	13
1.1.4 Sinergismo com Antimicrobianos	14
1.1.5 Mecanismos de Ação	16
1.1.6 Resistência do <i>Staphylococcus aureus</i> aos antimicrobianos	17
1.1.7 Relação entre a Colonização e Infecção por <i>Staphylococcus aureus</i>	20
1.1.8 Complicações relacionadas ao <i>Staphylococcus aureus</i>	26
1.1.8.1 Dermatite Atópica	26
1.1.8.2 Fibrose Cística	27
2. OBJETIVOS	28
3. MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 Extrato Etanólico de Própolis	29
3.2 Tipificação da Própolis	29
3.3 Cepas <i>Staphylococcus aureus</i>	30
3.4 Critérios de Inclusão e Exclusão	32
3.5 Inóculos	32
3.6 Diluição Seriada do Extrato de Própolis	33
3.7 Diluição Seriada do Álcool Etílico Neutro	34

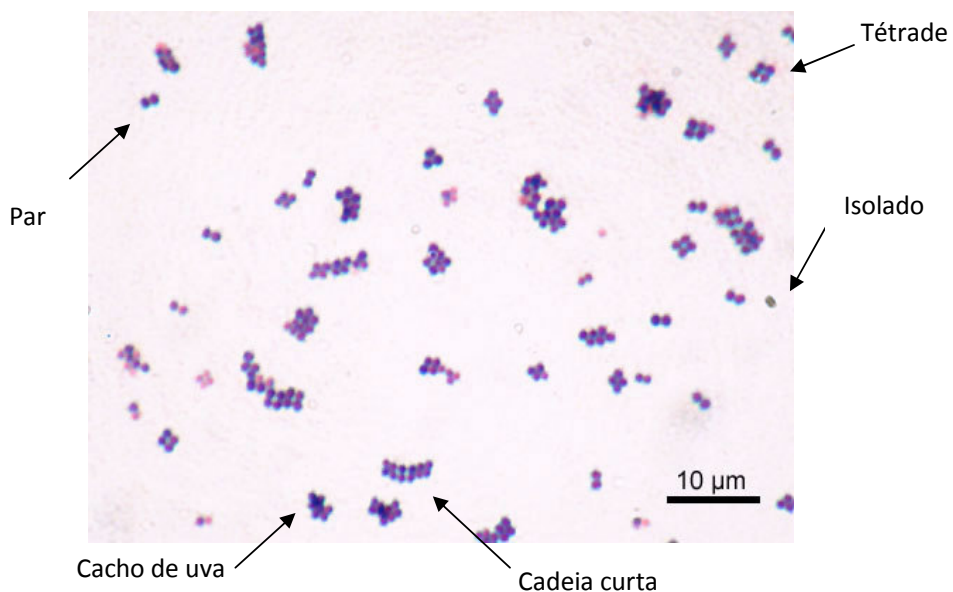
3.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima	34
3.9 Tratamento Estatístico	38
3.10 Pesquisa Experimental	38
3.11 Levantamento Bibliográfico	38
4. RESULTADOS	39
4.1 Concentração Inibitória Mínima	39
4.2 Tipificação da Própolis	45
5. DISCUSSÃO	48
5.1 Concentração Inibitória Mínima	48
5.2 Tipificação da Própolis	54
6. CONCLUSÕES	57
7. ANEXOS	58
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
FONTES CONSULTADAS	84
RESUMO	85
ABSTRACT	86
APÊNDICE	87



## 1. INTRODUÇÃO

### Características Gerais do *Staphylococcus aureus*

Pertencentes à família *Micrococcaceae*, os *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) são cocos Gram positivos, imóveis, não esporulados, anaeróbios facultativos, catalase e coagulase positivos e tipicamente não encapsulados ou com formação limitada de cápsula polissacarídica. Seu tamanho varia de 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  de diâmetro, podendo ocorrer em formas irregulares de cachos de uvas, isolados, pares, tétrades ou cadeias curtas<sup>(1-2)</sup>. A Fig. 1 representa *S. aureus* de diferentes formas, corados pela técnica de Gram e observados ao microscópio.



**FIGURA 1:** Microscopia da coloração de Gram do *S. aureus*

**Fonte:** [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/08/Staphylococcus\\_aureus\\_Gram.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/0/08/Staphylococcus_aureus_Gram.jpg)

(26 Fev, 2009)

Estes micro-organismos se encontram amplamente distribuídos no meio ambiente, sendo a pele e mucosas de mamíferos e aves o seu principal *habitat*<sup>(1)</sup>. O percentual de portadores nasais varia de 30% a 50% e é mais elevado entre pessoas que trabalham em ambientes hospitalares<sup>(3)</sup>. Geralmente, os *S. aureus* apresentam uma relação benigna ou simbiótica com seus hospedeiros, mas podem tornar-se patogênicos ao atingir os tecidos através de traumas na barreira cutânea, inoculação por agulhas ou implantes de dispositivos médicos contaminados<sup>(1)</sup>.

As doenças causadas pelos *S. aureus* podem ser classificadas em superficiais, invasivas, tóxicas ou mistas. Estes agentes são considerados uma das bactérias patogênicas mais importantes devido à ampla gama de infecções provocadas, sendo localizadas, geralmente superficiais, até algumas disseminadas, com elevada gravidade. Sua importância clínica tem crescido principalmente devido ao aumento da frequência de infecções hospitalares graves causadas por cepas multirresistentes<sup>(3)</sup>.

O desenvolvimento de infecções oportunistas é decorrente de fatores que predisõem o indivíduo e de características do micro-organismo que contribuem para sua capacidade de produzir a doença, denominados fatores de virulência<sup>(2)</sup>. As infecções estafilocócicas podem ser causadas por micro-organismos colonizantes do próprio indivíduo (infecções endógenas) ou adquiridos de portadores ou doentes (infecções exógenas), sendo através de contatos diretos ou indiretos<sup>(3)</sup>.

Os principais fatores de predisposição do indivíduo são:

- Lesões cutâneas;
- Presença de corpos estranhos;
- Infecções por outros agentes;

- Administração profilática ou terapêutica de agentes antimicrobianos;
- Alterações na destruição intracelular das bactérias após fagocitose;
- Alterações quimiotáticas dos leucócitos;
- Alterações na opsonização por anticorpos<sup>(2)</sup>.

Dentre os fatores de virulência expressos pelos *S. aureus*, os de maior relevância são:

- Presença de cápsula polissacarídica protegendo-os da fagocitose;
- Presença de peptidoglicano e ácidos teicóicos integrados à parede celular ativando a via alternativa do sistema complemento e estimulando a produção de citocinas;
- Presença da proteína A que se liga às imunoglobulinas da classe IgG impedindo que estes anticorpos interajam com as células fagocitárias e, assim, protegendo o micro-organismo contra a fagocitose;
- Presença de proteínas que se ligam à fibronectina, colágeno e fibrinogênio e atuam como adesinas, promovendo a colonização dos tecidos;
- Produção de toxinas como citotoxinas, superantígenos e um terceiro tipo que degrada moléculas de adesão das células epiteliais cutâneas. As citotoxinas como alfa-toxina e leucocidina possuem a capacidade de matar leucócitos. Entretanto, os superantígenos estimulam os linfócitos T a liberar citocinas, as quais provocam choques;
- Produção de enzimas extracelulares como coagulase, catalase, desoxirribonucleases, lipase, proteases entre outras que promovem a hidrólise de diferentes proteínas e moléculas, gerando nutrientes utilizáveis pelo *S. aureus* e facilitando a sua disseminação pelos tecidos<sup>(3)</sup>.

### Características Gerais da Própolis

A palavra própolis é derivada do grego *pro*, em defesa, e *polis*, cidade, ou seja, em defesa da colméia<sup>(4-5)</sup>. Suas propriedades anti-sépticas e antiinflamatórias são conhecidas desde a antiguidade, tendo sido utilizadas pelos sacerdotes egípcios, gregos e outras civilizações em unguentos e em cremes para embalsamar<sup>(6)</sup>.

A própolis é formada por material resinoso e balsâmico coletado pelas abelhas melíferas de diferentes exsudatos de plantas, tais como secreções de árvores, folhas e flores às quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final<sup>(5,7)</sup>.

Seu emprego na vida da colônia está relacionado com suas propriedades mecânicas, sendo utilizada na construção e adaptação da colméia, e antimicrobianas, garantindo um ambiente asséptico<sup>(7-8)</sup>.

A sua composição depende do local de coleta, condições ambientais, origem vegetal e espécies das abelhas<sup>(5,9,10,11)</sup>. A própolis possui composição química complexa, cuja coloração pode variar do amarelo claro, marrom esverdeado ao negro<sup>(12)</sup>. De uma maneira geral, a composição da própolis inclui 50% de resinas e bálsamos (compostas por flavonóides e ácidos fenólicos relacionados), 30% de cera, 10% de óleos essenciais, 10% de pólen e minerais<sup>(13-15)</sup>.

Estudos realizados mostram que mais de trezentas substâncias foram identificadas em amostras de própolis, com predominância de flavonóides, aldeídos aromáticos, cumarinas, ácidos aromáticos e alguns oligoelementos, tais como: alumínio, vanádio, ferro, cálcio, manganês, estrôncio e vitaminas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>6</sub> e C<sup>(12,16,17,18)</sup>. Aos flavonóides e ácidos fenólicos têm sido constatadas grande parte das atividades atribuídas à própolis<sup>(7)</sup>.



### Relevância

O uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos tem levado à seleção de micro-organismos patogênicos mutantes resistentes a esses compostos, tornando o uso de antimicrobianos de origem natural uma alternativa eficaz e econômica. O problema da resistência microbiana é crescente<sup>(19)</sup>, especialmente para patógenos nosocomiais. Opções terapêuticas para estas infecções são frequentemente limitadas, principalmente em pacientes debilitados e imunocomprometidos. Dentre os patógenos nosocomiais, cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina e vancomicina, *Enterococcus* spp. multirresistentes e *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) resistente a cinco ou mais antibióticos são os isolados bacterianos mais freqüentes<sup>(20)</sup>. A perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta. Portanto, devem ser tomadas atitudes que possam reduzir este problema como racionalizar o uso de antibióticos, desenvolver pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e continuar o estudo de desenvolvimento de novas drogas, tanto sintéticas como naturais<sup>(19)</sup>.



## 1.1 Revisão da Literatura

### 1.1.1 Própolis

A própolis é conhecida por suas propriedades biológicas tais como: antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, imunomodulatória, hipotensiva, cicatrizante, anestésica, anticancerígena, anti-HIV e anticariogênica<sup>(5,17,18,21,22,23)</sup>.

A amplitude das atividades farmacológicas da própolis é superior em zonas tropicais do que em regiões temperadas devido a maior diversidade vegetal das áreas tropicais em relação às temperadas<sup>(9)</sup>.

A propriedade antimicrobiana da própolis é amplamente relatada, sendo destacada sua ação sobre *S. aureus*, *Streptococcus pyogenes* (*S. pyogenes*), *Candida* spp e sobre inúmeros outros micro-organismos<sup>(24)</sup>. Foi verificado também que bactérias Gram positivas se mostram mais sensíveis que as Gram negativas aos extratos de própolis<sup>(5,9,17,23,24,25)</sup>.

Os motivos para a menor atividade antibacteriana da própolis em bactérias Gram negativas não são conhecidos. Acredita-se que apesar da estrutura menos rígida da parede celular estas são quimicamente mais complexas e possuem um teor lipídico maior do que as Gram positivas. Tais características podem estar relacionadas com a maior resistência deste grupo frente a extratos de própolis<sup>(5,19)</sup>.

A própolis tornou-se objeto de estudos químicos e farmacológicos há cerca de 30 anos. Entretanto, somente a partir da última década (1990) cientistas começaram a comprovar que amostras diferentes de própolis poderiam ser diferentes em relação à composição química e atividades biológicas<sup>(10)</sup>.

A composição química da própolis depende da flora local e também de características geográficas, climáticas e da variabilidade genética das abelhas<sup>(5,9,10,11,22)</sup>. Assim, as variabilidades químicas de diferentes amostras de própolis induzem a concluir que as propriedades seriam também diferentes. Entretanto, na maioria dos casos não é o que ocorre. Na verdade, a própolis é responsável por defender as abelhas contra infecções, portanto, as atividades antibacterianas e antifúngicas estão presentes em diferentes amostras<sup>(9,10,22,26)</sup>. A similaridade em muitos outros tipos de atividades é menos óbvia, mas é fato. Ou seja, os compostos químicos responsáveis por proporcionar tais atividades são diferentes, mas levam a resultados similares<sup>(10-11)</sup>.

Assim, o fato de que diferentes composições químicas da própolis apresentarem atividades semelhantes e, em alguns casos, até da mesma ordem de magnitude, é impressionante.

Estudos comparativos são importantes para a padronização da própolis e posteriormente para aplicações terapêuticas. Estes resultados irão relacionar composições químicas particulares de determinadas própolis para promover atividades biológicas específicas e, em seguida, formular recomendações clínicas. Assim, o público em geral poderá beneficiar-se das propriedades da própolis como parte da Medicina Complementar<sup>(10)</sup>.

Estudos demonstraram que amostras de própolis com origens geográficas diversas apresentam grandes diferenças nas composições químicas, entretanto, todas exibem significantes atividades antibacteriana, antifúngica e na maioria delas antiviral. Tais resultados demonstram que em diferentes amostras, as atividades

antimicrobianas dependem do sinergismo entre os diversos compostos químicos presentes<sup>(5,9,10,11,26)</sup>.

Entretanto, a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extrato etanólico de própolis (EEP) com alto conteúdo de flavonóides em comparação a uma solução etanólica contendo galangina isolada do respectivo extrato frente a cepas de *S. aureus* resistentes à meticilina (MRSA - *Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*), apresentou resultados significativamente inferiores para a fração isolada<sup>(20)</sup>. Outro estudo relata que frações isoladas de ácidos fenólicos não demonstraram resultados antimicrobianos quando avaliados individualmente<sup>(27)</sup>.

A variação da composição química da própolis, por um lado, é um fator preocupante para sua industrialização e utilização e, por outro lado, contribui para o aparecimento de propostas para o controle químico de qualidade deste produto<sup>(8,28)</sup>. Entretanto, a diversidade da composição química da própolis é uma característica favorável para sua utilização como antimicrobiano, pois evita o desenvolvimento de mecanismos de resistências pelos micro-organismos. Por esta razão, a própolis deveria ser vista como um complexo recurso natural para controle dos micro-organismos ao invés de uma fonte de antimicrobianos potentes<sup>(8)</sup>.

Nas zonas temperadas (Europa, América do Norte e oeste da Ásia), a fonte vegetal predominante da própolis é *Populus sp*<sup>(5,15,29)</sup>. As amostras de própolis provenientes destas regiões têm uma composição química muito similar, sendo os principais componentes: flavonóides, agliconas, ácidos aromáticos e seus ésteres. Entretanto, nas regiões tropicais a espécie vegetal do gênero *Populus* não é nativa e as abelhas retiram a resina de outras plantas, por isso, a composição química de amostras de tais regiões é muito diferente das de zonas temperadas<sup>(29)</sup>. Outras

espécies vegetais empregadas como fontes de própolis em várias partes do mundo são pinheiros, carvalho, salgueiro, acácia, entre outras<sup>(5,15)</sup>.

Estudos das composições químicas de diferentes amostras de própolis classificou-as, em relação à origem, em grandes regiões geográficas de acordo com a Tab. 1<sup>(30)</sup>. Estes resultados mostraram diferenças importantes entre as composições das amostras brasileiras em relação às de várias outras regiões do mundo, sendo a própolis brasileira pobre em flavonóides. Por este motivo, o desenvolvimento de métodos de análises das própolis brasileiras passou a ter uma grande importância<sup>(29)</sup>.

Em relação à atividade antimicrobiana, a própolis europeia está associada à presença de flavonóides e derivados do ácido caféico. Entretanto, no caso de amostras tropicais, os compostos bioativos são, principalmente, ácidos fenólicos e derivados prenilados<sup>(31)</sup>.

**TABELA 1:** Classificação da própolis quanto à origem geográfica, fonte vegetal e principais constituintes.

<b>Origem Geográfica</b>	<b>Fonte Vegetal</b>	<b>Principais constituintes</b>
Europa Ásia América do Norte	<i>Populus</i> spp. (choupo)	Flavonóides como: pinocembrina, pinobanksina, pinobanksina-3-O-acetato, crisina, galangina, ácidos aromáticos: cafeico, ferúlico e cafeatos de: benzila, feniletila e prenila
Rússia (região Norte)	<i>Betula verrucosa</i> (bétula)	Flavonóides como: acacetina, apigenina, ermanina, ramnocitrina, canferida, outros compostos como: $\alpha$ -acetóxibetulenol
Brasil	<i>Baccharis</i> spp. <i>Araucaria</i> spp.	Ácidos p-cumáricos prenilados, acetofenonas preniladas, ácidos diterpênicos, entre outros
Ilhas Canárias	Desconhecida	Lignanas furofurânicas

Fonte: Bankova *et al* (2000)<sup>(30)</sup>

A própolis brasileira pode ser classificada de acordo com a presença de marcadores químicos. Esta tipificação é relacionada com a região geográfica da coleta de resina vegetal pelas abelhas. A própolis brasileira pode ser agrupada em quatro tipos: BRG, BRP(PR) , BRP(SP/MG) e BRPG, sendo este último uma interface entre os tipos BRP(PR) e BRG, com compostos destes dois grupos<sup>(29)</sup>. A Tab. 2 resume as principais características dos tipos BRG, BRP(PR) e BRP(SP/MG).

**TABELA 2:** Tipificação da própolis brasileira baseada em marcadores químicos.

<b>Tipo</b>	<b>Marcadores</b>	<b>Estados Brasileiros</b>
BRG	- Vanilina - 3-metóxi-4-hidroxicinamaldeído - (2-[1-hidroximetil]-vinil-6-acetil-5-hidroxicumarano)	Paraná Santa Catarina Rio Grande do Sul
BRP(PR)	- 2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano - Ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico - Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico - Ácido caféico - Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico - Ácido p-cumárico	Paraná
BRP(SP/MG)	- Ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico - Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico - Ácido caféico - Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico - Ácido p-cumárico	São Paulo Minas Gerais Rio de Janeiro

Fonte: Marcucci, 2008<sup>(29)</sup>



Em 19 de Janeiro de 2001, o Ministério da Agricultura e do Abastecimento aprovou a Instrução Normativa nº 3 para instituir medidas que regulam a industrialização de produtos apícolas como: apitoxina, cera de abelha, geléia real, pólen, própolis e extrato de própolis.

O Anexo VII desta Instrução (Regulamento de Identidade e Qualidade de Extrato de Própolis) tem como objetivo estabelecer a identidade e os requisitos mínimos de qualidade a que deve atender o Extrato de Própolis destinado ao comércio nacional ou internacional. Neste constam parâmetros organolépticos e físico-químicos, sendo o índice mínimo de 11% (m/V) de extrato seco e o teor alcoólico máximo de 70° GL (V/V) de maior importância para este trabalho<sup>(32)</sup>.

### **1.1.2 Toxicidade da Própolis**

Extratos de própolis apresentam uma baixa toxicidade aguda por via oral. Os valores encontrados em estudos realizados para DL<sub>50</sub> (Dose Letal) variam de 2000 a 7300 mg/kg em ratos<sup>(4)</sup>.

Para avaliação da toxicidade por uso de múltiplas doses de EEP, administrados por via oral, em ratos, foram realizados estudos com níveis de até 4000 mg/kg/dia. Após duas semanas de tratamento, não foram observadas mortes, os pesos corporais aumentaram normalmente e não foram encontradas anormalidades após necropsia dos animais<sup>(4,33)</sup>.

Extratos alcoólicos de própolis acrescentados à água para consumo de ratos, nas concentrações de 1400 mg/kg/dia, por 90 dias, é declarada como NOEL (*Non-*

*observed effect level*). Outro estudo conduzido de maneira semelhante, entretanto, com doses de 2470 mg/kg/dia, por 60 dias, não demonstraram efeitos colaterais relacionados à administração da própolis<sup>(4,33)</sup>.

Testes de irritabilidade cutânea, em coelhos, mostraram que extratos de própolis em acetona a 20% e aplicações diretas de extratos de própolis ou pomadas que o contêm não são capazes de provocar irritações<sup>(33)</sup>. Entretanto, presença de efeitos adversos, principalmente relacionados a reações alérgicas como irritações de pele ou mucosas, são relatadas como comuns em doses acima de 15 g/dia<sup>(34)</sup>.

### **1.1.3 Aplicação em Queimaduras**

Pesquisadores relataram que a infecção em pacientes que apresentam queimaduras é a maior causa de óbitos. A presença de grandes extensões de queimaduras são portas de entrada para muitos micro-organismos, além da necrose dos tecidos tornarem os ambientes favoráveis para a multiplicação microbiana<sup>(35)</sup>.

Atualmente, o tratamento de pacientes queimados consiste, basicamente, na remoção cirúrgica dos tecidos necrosados, suplementação de líquidos e proteção das feridas contra infecções. Contudo, o uso preventivamente de antibióticos locais não é garantia de esterilidade da ferida, pois muitos deles são inativados pela presença microbiana ou promovem a resistência dos micro-organismos<sup>(35)</sup>.

Frente a este cenário, o interesse na apiterapia, a qual utiliza produtos apícolas, devido às propriedades cicatrizantes, é crescente. Uma das substâncias farmacopeicas mais conhecidas com estas atribuições é a própolis. Além de acelerar

o processo de regeneração de tecidos, as propriedades antimicrobianas do produto favorecem a cicatrização de feridas, especialmente as infectadas<sup>(36)</sup>.

#### **1.1.4 Sinergismo com Antimicrobianos**

Há um constante aumento da incidência da resistência a antimicrobianos pelo mundo. Esta resistência tem se dispersado particularmente em patógenos causadores de infecções hospitalares, mas também em micro-organismos causadores de infecções adquiridas na comunidade<sup>(11)</sup>.

A resistência a antibióticos acarreta complicações das doenças, óbitos e custos associados aos cuidados com saúde, justificando a necessidade da administração de novos agentes antimicrobianos<sup>(11)</sup>.

A presença de sinergismo *in vitro* entre própolis e drogas antimicrobianas tem sido investigada, sendo que formulações contendo associações de própolis com antibióticos são potencialmente de interesses médicos<sup>(13)</sup>.

O EEP apresentou significativa atividade antimicrobiana frente a cepas Gram positivas isoladas clinicamente. A adição de EEP a testes de drogas antibacterianas aumentou drasticamente o efeito antimicrobiano de ampicilina, gentamicina, estreptomicina, moderadamente a cloranfenicol, ceftriaxona e vancomicina, entretanto não apresentou efeito sinérgico para eritromicina. Os resultados sugerem uma ação inibitória do EEP na atividade da lipase (cepas de *Staphylococcus* spp) e um efeito inibitório na coagulase de cepas de *S. aureus* testadas<sup>(37)</sup>.

Outros estudos mostram que a própolis apresenta efeito sinérgico frente a diferentes antibióticos, inclusive contra cepas resistentes à benzilpenicilina, tetraciclina e eritromicina<sup>(5)</sup>.

Também foram realizados estudos para avaliação de sinergismo frente a cepas de *S. aureus*, *Klebsiela pneumoniae* (*K. pneumoniae*) e *Candida albicans* (*C. albicans*) resistentes ou multirresistentes a antibióticos comumente administrados para o tratamento de infecções causadas por estes micro-organismos. Foi demonstrado o efeito potencial do EEP em aumentar a ação antibiótica, além de comprovar que as resistências das cepas testadas não influenciam às susceptibilidades ao EEP<sup>(11)</sup>.

Estudos para avaliação do sinergismo *in vitro* frente a cepas de *S. aureus* e antibióticos, através do método de disco difusão e E-test®, revelaram que a presença do EEP potencializou a ação antimicrobiana de cinco drogas: cloranfenicol, gentamicina, netilmicina, tetraciclina, vancomicina e cloranfenicol, gentamicina, netilmicina, tetraciclina e clindamicina, respectivamente<sup>(13)</sup>.

O sinergismo observado com drogas que atuam na síntese protéica (cloranfenicol, gentamicina, netilmicina, tetraciclina e clindamicina) e a ausência de antagonismos entre o EEP e as drogas testadas são informações importantes, entretanto, preliminares. Devido à possibilidade de bactérias tornarem-se resistentes a antibióticos, os sinergismos relatados são relevantes e a própolis pode constituir uma alternativa viável para o tratamento desses patógenos<sup>(13)</sup>. A combinação de própolis com agentes antimicrobianos poderiam permitir a redução da dose do antibiótico escolhido, além de potencializar a terapêutica e, portanto, de interesses médicos, especialmente para usos tópicos<sup>(11)</sup>.

Contudo, para definição da real eficácia do sinergismo entre EEP e outras drogas são necessários estudos clínicos controlados. Estes estudos podem promover o uso clínico de associações de drogas antimicrobianas com extratos de própolis para doenças decorrentes de infecções estafilocócicas<sup>(13)</sup>.

### **1.1.5 Mecanismos de Ação**

Alguns mecanismos da atividade da própolis em relação ao crescimento bacteriano têm sido apresentados: inibição da divisão celular, colapso do citoplasma bacteriano, membranas ou paredes celulares, lise das bactérias e inibição da síntese protéica<sup>(13,20,38)</sup>. A inibição da RNA-polimerase por componentes presentes na própolis foi verificada e pode explicar parcialmente o sinergismo existente entre o EEP e drogas que atuam na inibição da síntese protéica<sup>(13)</sup>.

As atividades antibacteriana e antifúngica da própolis foram atribuídas, principalmente, à flavonona pinocebrina, ao flavonol galangina e ao cafeato de feniletila (éster do ácido caféico), com um mecanismo de ação baseado provavelmente na inibição da RNA-polimerase bacteriana. Outros componentes como flavonóides, ácidos caféico, benzóico e cinâmico, provavelmente agem na membrana ou parede celular do micro-organismo, causando danos funcionais e estruturais<sup>(5)</sup>.

### 1.1.6 Resistência do *Staphylococcus aureus* aos antimicrobianos

O aparecimento de micro-organismos multirresistentes é um problema crescente que requer medidas contínuas e, frequentemente caras, para controlar as infecções associadas aos serviços de saúde<sup>(39)</sup>.

O *S. aureus* é talvez o patógeno de maior preocupação clínica, devido aos seus fatores de virulência intrínsecos, a habilidade em causar diversas infecções com altos riscos de levar os pacientes a óbitos, além da capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais. A mortalidade de pacientes por bacteremia causada por *S. aureus* atinge aproximadamente 20% a 40%, apesar da disponibilidade de antimicrobianos efetivos. O *S. aureus* é agora a principal causa mundial de infecções hospitalares e, com o aumento de pacientes tratados fora dos estabelecimentos hospitalares, este passa a ser uma preocupação crescente também na comunidade<sup>(40)</sup>.

A mortalidade de pacientes com bacteremias causadas por *S. aureus* antes da administração de antibióticos (Década de 1940) era superior a 80% e, mais de 70% desenvolviam infecções metastásicas. No início da década de 40, com a introdução da penicilina, o prognóstico destes pacientes melhorou muito. Entretanto, já no início de 1942, foram relatadas cepas de *Staphylococcus* resistentes à penicilina, primeiro em hospitais e, em seguida, na comunidade. No final dos anos 60, mais de 80% dos isolados de *Staphylococcus*, tanto hospitalares quanto comunitários, eram resistentes à penicilina<sup>(40)</sup>.

Este padrão de resistência, primeiro nos hospitais e, em seguida, na comunidade, é atualmente um modelo bem estabelecido que se repete a cada novo antimicrobiano introduzido<sup>(40)</sup>.

A resistência à penicilina é atribuída à presença da enzima denominada  $\beta$ -lactamase, a qual é codificada através do gene *blaZ*<sup>(40)</sup>.

Em 1961, a meticilina foi introduzida, sendo a primeira penicilina semi-sintética resistente a  $\beta$ -lactamase. A introdução do antimicrobiano foi rapidamente seguida por relatos de isolados resistentes à meticilina. As primeiras detecções ocorreram em hospitais, nos anos 60, entretanto, atualmente é reconhecida na comunidade<sup>(40)</sup>. Enquanto as infecções ocorriam em pacientes com contatos prévios em hospitais, recentemente, há um número crescente de indivíduos sem exposições anteriores a hospitais, denominadas como infecções adquiridas na comunidade<sup>(40-41)</sup>.

No Brasil, a meticilina não é utilizada. Por este motivo, os micro-organismos definidos como MRSA são na verdade *S. aureus* resistentes à oxacilina (ORSA - *Oxacillin-resistant Staphylococcus aureus*). Entretanto, devido às similaridades entre meticilina e oxacilina a designação MRSA é usualmente aceita<sup>(39)</sup>.

Em 1998, estudos do CDC (*Center for Disease Control and Prevention* – Estados Unidos) mostraram que as infecções causadas por MRSA correspondem a 55% do total de infecções estafilocócicas<sup>(42)</sup>.

A resistência à meticilina é mediada pela presença da proteína PBP2a (*Penicillin binding proteins 2a*) localizada na parede celular bacteriana, a qual apresenta baixa afinidade aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. O gene *mecA* presente no DNA bacteriano é o responsável pela síntese desta proteína<sup>(39,43)</sup>.

Apesar do desenvolvimento de outras penicilinas semi-sintéticas também resistentes a  $\beta$ -lactamase como oxacilina, cloxacilina e dicloxacilina o surgimento de cepas de micro-organismos resistentes não demorou a acontecer<sup>(39)</sup>.

Estudos identificaram fatores de riscos relacionados à colonização ou infecção por *S. aureus* resistentes a meticilina, tais como: idade avançada, paciente do sexo masculino, hospitalizações prévias ou longas, admissão em unidades de queimados ou centros de tratamentos intensivos, doenças crônicas, antibioticoterapia prévia, exposição a pacientes colonizados ou infectados, procedimentos invasivos e cirurgias gastrointestinais<sup>(39,41,42)</sup>.

Neste contexto, o uso de glicopeptídeos e principalmente a vancomicina para tratar infecções causadas por MRSA tem aumentado consideravelmente<sup>(40,43)</sup>. Entretanto, em 1997, foi identificado no Japão o primeiro caso de uma cepa de *S. aureus* com susceptibilidade reduzida à vancomicina (VISA - *Vancomycin-intermediate Staphylococcus aureus*). Em seguida, casos adicionais foram relatados originários de outros países<sup>(40)</sup>.

A prevenção a infecções causadas por *S. aureus* tem se limitado a adoções de medidas de controles para as infecções. Recentemente, métodos diagnósticos mais rápidos, que detectam a presença de *S. aureus* ou outros patógenos e permitem identificações e isolamentos dos pacientes colonizados, podem aumentar a eficiência dessas medidas<sup>(40)</sup>.

Devido às relações existentes entre a colonização nasal de pacientes por *S. aureus* e os riscos aumentados de infecções subseqüentes, o uso tópico de antimicrobianos para a eliminação do micro-organismo tem sido levado em



consideração como agente descolonizante. Recentemente, o uso potencial de novos agentes com este propósito foi avaliado e tem sido considerado<sup>(40)</sup>.

A dificuldade para tratamento de infecções causadas por *S. aureus* resistentes ou multirresistentes é um exemplo da diminuição da eficácia dos agentes antimicrobianos para tratamento de infecções bacterianas. Sendo assim, opções terapêuticas ou para controle das infecções têm se tornado cada vez mais necessárias<sup>(40)</sup>.

#### **1.1.7 Relação entre a Colonização e Infecção por *Staphylococcus aureus***

O *S. aureus* é um dos patógenos mais freqüentes causadores de infecções endêmicas e epidêmicas adquiridas em hospitais, resultando em taxas de mortalidade e morbidade significativas. Infecções adquiridas na comunidade também são comuns<sup>(44)</sup>.

Cepas multirresistentes de *Staphylococcus* têm sido apresentadas com freqüência crescente por todo o mundo, incluindo isolados resistentes à metilina, lincosamidas, macrolídeos, aminoglicosídeos, fluoroquinolonas ou combinações destes antibióticos. Os glicopeptídeos são considerados os principais antibióticos com atividades confiáveis frente a cepas de MRSA. Entretanto, a emergência de cepas com resistências intermediárias aos glicopeptídeos gerou preocupação em relação ao desenvolvimento de resistência aos antibióticos disponíveis. Assim, devido às conseqüências provenientes de infecções por *S. aureus* a prevenção tem

sido considerada relevante. Pacientes colonizados são as principais fontes de *S. aureus* nos hospitais. Aproximadamente 10% a 40% dos pacientes, ambulatoriais ou hospitalares, testados são portadores de *S. aureus* na região nasal. Estes microorganismos colonizantes podem ser considerados como reservatórios e causadores de infecções endógenas e, também, podem ser dispersados para outros pacientes<sup>(44)</sup>.

Diversos estudos têm demonstrado que a eliminação da colonização nasal, o principal reservatório de *S. aureus*, reduz a incidência de infecções por estes microorganismos<sup>(44)</sup>. Pacientes colonizados têm maiores riscos de contraírem infecções estafilocócicas após procedimentos médicos ou cirúrgicos em relação aos não colonizados. Pacientes hospitalizados e colonizados com MRSA apresentam riscos de infecções entre 11% e 38%<sup>(42)</sup>. E, também, pacientes colonizados tem 2 a 9 vezes mais chances de desenvolverem infecções do sítio cirúrgico do que os não colonizados<sup>(45-46)</sup>. Muitos estudos têm demonstrado que pacientes colonizados, quando admitidos em centros de tratamentos intensivos, têm um risco aumentado para o desenvolvimento de infecções hospitalares<sup>(46)</sup>.

O *S. aureus* é o principal patógeno causador de infecções hospitalares, incluindo bacteremia e infecções de feridas cirúrgicas<sup>(47-48)</sup>. Aproximadamente 25% das infecções hospitalares são causadas por *S. aureus* acometendo tanto pacientes cirúrgicos quanto não cirúrgicos<sup>(45-47)</sup>. Estas infecções hospitalares estão associadas significativamente com as taxas de morbidade e mortalidade, além disso, a disseminação de MRSA tem aumentado ainda mais estes índices. Apesar do MRSA não ser considerado mais patogênico do que *S. aureus* sensível à meticilina, o tratamento destas infecções é mais problemático<sup>(48)</sup>.

A resistência aos agentes antimicrobianos tem se tornado um problema global e crescente. Dentre dois milhões de pessoas que adquirem infecções hospitalares nos Estados Unidos a cada ano, 70% dos casos já envolvem cepas resistentes a pelo menos um antibiótico. A maior causa de preocupação é o MRSA, o qual surgiu em baixos níveis há uma década atrás, entretanto, atualmente representa cerca de 50% de todos os *S. aureus* isolados<sup>(49)</sup>, sendo também o MRSA o patógeno resistente mais frequentemente identificado em hospitais por todo o mundo<sup>(50)</sup>.

Infecções estafilocócicas ocorrem regularmente em pacientes hospitalizados e podem provocar conseqüências severas tais como: infecções das feridas cirúrgicas, pneumonia hospitalar e bacteremia relacionadas ao uso de cateteres<sup>(48)</sup>. A cada ano, mais de 40 milhões de pacientes se submetem a cirurgias nos Estados Unidos, sendo que mais de 20% destes indivíduos adquirem pelo menos uma infecção hospitalar no período pós-operatório<sup>(45)</sup>. Um estudo recente com mais de sete milhões de pacientes admitidos em hospitais, nos Estados Unidos, estimou que 0,8% de todos os pacientes adquiriram infecções por *S. aureus*, correspondendo a um total de quase trezentos mil pacientes. As principais conseqüências deste índice são os impactos econômicos, estimados em 2,7 milhões de dias adicionais na internação dos pacientes e 9,5 bilhões de dólares em custos extras, além de pelo menos doze mil óbitos. Frente a estes dados, estratégias efetivas para a prevenção das infecções são essenciais<sup>(48)</sup>.

Há uma forte correlação entre pacientes com bacteremias causadas por *S. aureus* e as cepas provenientes de colonizações nasais e aquelas isoladas do foco infeccioso e de amostras do sangue, sugerindo que as bacteremias por *S. aureus* podem ser de origem endógena. Ou seja, estratégias para interromper transmissões

do patógeno através da eliminação da colonização nasal podem prevenir infecções sistêmicas por *S. aureus*<sup>(44)</sup>.

Resultados recentes mostram que 80% das bacteremias hospitalares causadas por cepas de *S. aureus* são endógenas e provenientes das narinas dos pacientes colonizados<sup>(47)</sup>.

A grande maioria dos pacientes com bacteremias causadas por *S.aureus* apresentam isolados idênticos na amostra sanguínea e na amostra nasal. Estudos, através de eletroforese, mostraram que entre as cepas isoladas de culturas sanguíneas e nasais estas foram consideradas mono-clonais em 82,2% e 85,7% dos pacientes<sup>(44)</sup>.

Além disto, muitos estudos efetuados em cirurgias em geral têm demonstrado que a colonização nasal é, essencialmente, uma condição indispensável para o desenvolvimento de infecções por *S. aureus*. Estudos revelaram que mais de 80% da população hospitalar em geral e 100% dos centros de tratamentos intensivos apresentam as mesmas cepas tanto nas regiões colonizadas quanto infectadas<sup>(51)</sup>.

Tradicionalmente, o controle deste micro-organismo tem sido focado na prevenção de infecções cruzadas entre os pacientes, entretanto, tem se demonstrado repetidamente que uma grande proporção de infecções hospitalares por *S. aureus* é proveniente da própria flora do paciente<sup>(47-48)</sup>. A presença de *S. aureus* na região nasal parece desempenhar um papel fundamental na patogênese das infecções<sup>(44)</sup>. Por este motivo, a colonização nasal por *S. aureus* é atualmente considerada um fator de risco para infecções subseqüentes em vários grupos de pacientes como aqueles: em diálise, cirrose hepática, submetidos a cirurgias, uso de dispositivos invasivos e internados em centros de tratamentos intensivos<sup>(44,47,48)</sup>.

A prevenção e tratamento de infecções causadas por *S. aureus* tem se tornado tarefa difícil devido ao surgimento de cepas multirresistentes. Neste contexto, o uso de produtos naturais tem sido uma estratégia para o descobrimento de novos medicamentos<sup>(52)</sup>.

A própolis tem sido estudada extensamente devido as suas propriedades biológicas, mas principalmente pelas atividades antimicrobianas. Embora a ação antimicrobiana de EEP frente a cepas de *S. aureus* já foram apresentadas, poucos estudos têm sido efetuados em relação aos MRSA<sup>(52)</sup>.

Estudos revelaram que a própolis possui efeito sinérgico com administrações conjuntas à mupirocina para o controle de colonizações e infecções nasais por MRSA em coelhos<sup>(52)</sup>.

A taxa de infecções hospitalares é muito mais alta em pacientes admitidos em centros de tratamentos intensivos do que pacientes em geral. Essas infecções estão associadas ao prolongamento da internação, elevação dos custos e taxas de mortalidade. O *S. aureus* é um dos agentes etiológicos mais freqüentes nas infecções adquiridas nestes centros e o impacto tem aumentado devido à incidência crescente de cepas resistentes à meticilina. Em áreas consideradas endêmicas, um terço ou mais das infecções por *S. aureus* podem ser causadas por MRSA<sup>(51)</sup>.

Os MRSA são resistentes a penicilinas, cefalosporínicos e outros antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. E também, os MRSA, podem ser resistentes aos antimicrobianos da classe dos macrolídeos, clindamicina, cloranfenicol, aminoglicosídeos e substâncias antissépticas. Devido ao número limitado de antibióticos para uso terapêutico, infecções por MRSA são consideradas ameaçadoras e sua importância tem se elevado<sup>(52)</sup>.

Cepas de MRSA facilmente colonizam hospedeiros, particularmente pacientes imunodeficientes e podem causar sérias infecções, as quais são frequentemente de difícil controle. A colonização nasal por MRSA tem sido considerada um fator de risco para infecções adquiridas na comunidade e serviços de saúde<sup>(52)</sup>. Pacientes colonizados com MRSA são as principais fontes para a dispersão do patógeno para outros pacientes hospitalizados, principalmente através das mãos ou luvas da equipe de assistência à saúde. Estes últimos, quando colonizados pelo micro-organismo, mesmo que transitoriamente, também são considerados reservatórios potenciais para a disseminação<sup>(50)</sup>. A eliminação dos *Staphylococcus* spp, principalmente MRSA, das narinas dos pacientes constitui uma regra crucial nos protocolos de controles de infecções. Diferentes antimicrobianos de uso tópico têm sido utilizados para eliminar as colonizações nasais<sup>(47)</sup>.

Tratamentos com antibióticos locais, como pomadas de mupirocina, são frequentemente prescritos para a erradicação nasal, tanto por *S. aureus* quanto por MRSA<sup>(45,46,48,52)</sup>. Em contrapartida, o aumento do uso do antibiótico em pacientes ou funcionários colonizados tem elevado a resistência à mupirocina. A partir de 1990 o número de registros de resistência de cepas MRSA à mupirocina tem crescido<sup>(52)</sup>.

Foi demonstrado por um estudo que a aplicação intranasal de mupirocina, duas vezes ao dia, por cinco dias, erradicou o *S. aureus* em 83% a 88% dos pacientes colonizados e reduziu a colonização nas mãos<sup>(47)</sup>. Vários estudos têm mostrado que pacientes que irão se submeter a cirurgias ou diálises se beneficiam da erradicação da colonização nasal por *S. aureus*, pois reduzem as infecções hospitalares causadas por este micro-organismo<sup>(44,47,48)</sup>. Quando as narinas são tratadas topicamente para a eliminação da colonização por *S. aureus*, geralmente estes patógenos desaparecem também de outras áreas do corpo. Um dos estudos

demonstrou, também, que dentre os pacientes que passam por hemodiálise, 87% daqueles que apresentam colonização nasal e nas mãos por *S. aureus* carregam as mesmas cepas em ambos os locais. O mecanismo proposto da patogênese das infecções endógenas é a colonização da pele a partir das narinas, o que causa infecções subseqüentes em pacientes com áreas da pele debilitadas, tais como pacientes que recebem diálises ou com cateteres intravasculares<sup>(44)</sup>.

### **1.1.8 Complicações relacionadas ao *Staphylococcus aureus***

#### **1.1.8.1 Dermatite Atópica**

A dermatite atópica é uma doença crônica que afeta 15% a 20% da população infantil e se caracteriza por prurido e lesões eczematosas. A infecção por *S. aureus* é a complicação mais comum da doença. Indivíduos com dermatite atópica apresentam *S. aureus* na pele e narinas. A antibioticoterapia contra estes micro-organismos é componente importante do tratamento, pois evita infecções secundárias e o aumento da severidade da doença. Entretanto, a emergência de cepas de MRSA adquiridas na comunidade representam um novo desafio à terapêutica desses pacientes, já que o uso contínuo de antibióticos, sistêmicos ou tópicos, podem aumentar o risco do desenvolvimento da resistência bacteriana<sup>(53)</sup>.

### 1.1.8.2 Fibrose Cística

A fibrose cística é uma doença de origem genética, autossômica recessiva, cuja incidência, em estudos de detecção neonatal precoce, é variável nos diferentes países e raças. Nos últimos 50 anos, a sobrevivência dos pacientes com esta enfermidade tem aumentado devido aos avanços terapêuticos e o acompanhamento por unidades multidisciplinares. A alteração ou ausência da proteína da membrana CFTR (*Cystic Fibrosis Transmembrane Regulation*) que funciona como um canal iônico permeável a cloreto ocasiona secreções espessas nas vias respiratórias que favorecem as infecções bacterianas por *S. aureus*, *Haemophilus influenzae* (*H. influenzae*) e *P. aeruginosa* e acabam estimulando uma resposta inflamatória mediada basicamente por neutrófilos, aumentando ainda mais os danos dos tecidos<sup>(54)</sup>.

Assim, devido aos múltiplos ciclos de antibióticos que os pacientes fibrocísticos recebem, para tratar as infecções respiratórias recorrentes, o aparecimento de micro-organismos multirresistentes é cada vez mais freqüente, como o MRSA<sup>(54)</sup>.



**OBJETIVOS**

---

## 2. OBJETIVOS

- Determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* de EEP frente a cepas de *S. aureus* provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo (FCMSCSP) e definir as CIM para promover a inibição do crescimento de 50% e 90% das cepas incluídas no trabalho (CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub>, respectivamente).
- Tipificar a própolis *in natura* e o respectivo extrato etanólico quanto à presença de marcadores químicos pré-definidos.



### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Extrato Etanólico de Própolis**

Para a avaliação antimicrobiana foi utilizado EEP cedido pela empresa Novo Mel®. O teor alcoólico e a concentração de extrato seco na amostra correspondia a 73° GL (% V/V) e 22,8%, respectivamente (Anexo 1).

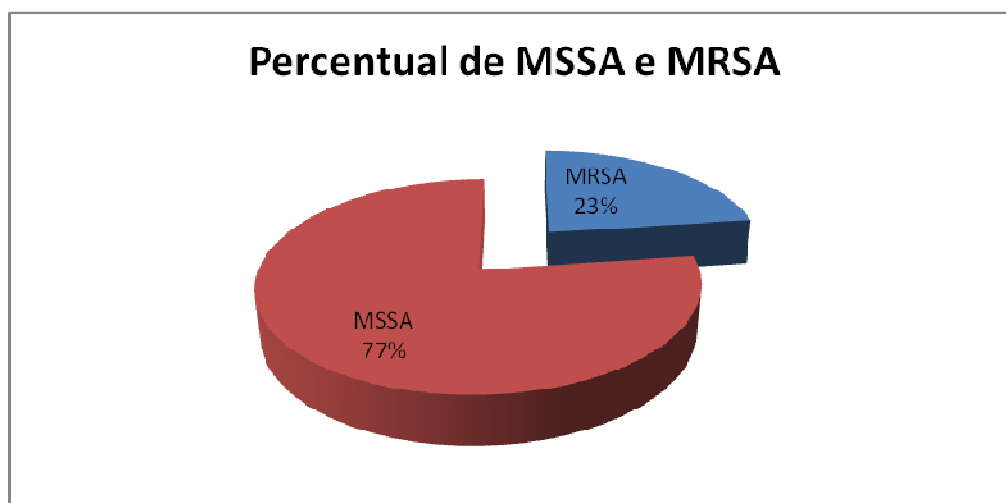
#### **3.2 Tipificação da Própolis**

Para a tipificação da amostra de própolis foi utilizada a metodologia desenvolvida e descrita por Marcucci (2000)<sup>(55)</sup>. A própolis bruta e os extratos foram analisados tal qual, com diluições de 1% a 10% (Diluyente: Metanol grau cromatográfico - Merck®). As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido de alta eficiência com rede de fotodiodos e injetor automático da Merck-Hitachi modelo D-7000. As condições cromatográficas foram:

- Fase móvel: Solução Água-ácido fórmico PA - Merck® diluído na proporção 95:5 (Solvente A) e Metanol grau cromatográfico - Merck® (Solvente B)
- Fluxo de eluição: 1 mL / min com utilização de gradiente linear
- Tempo máximo de análise: 50 minutos
- Detecção: comprimentos de onda de 280 nm e 340 nm

### 3.3 Cepas *Staphylococcus aureus*

Foram incluídas no estudo 210 cepas de *S. aureus* provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da FCMSCSP, sendo aproximadamente 78% enviadas através do Laboratório Central da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo (ISCMSP), previamente isoladas e identificadas como MRSA (*Methicillin-resistant Staphylococcus aureus*) ou MSSA (*Methicillin-susceptible Staphylococcus aureus*). A relação entre as cepas participantes do estudo está ilustrada no Gráf. 1, e a relação numérica de todas as cepas utilizadas com as respectivas identificações da bacterioteca e as classificações dos micro-organismos estão descritas no Anexo 2.



**GRÁFICO 1:** Percentual de cepas MSSA e MRSA incluídas no trabalho

Os testes e as interpretações da susceptibilidade das cepas foram realizados seguindo-se o preconizado pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) vigente<sup>(56)</sup>. A partir de colônias isoladas de *S. aureus*, previamente diagnosticadas através da bacterioscopia, aspectos macroscópicos das colônias e confirmações bioquímicas de catalase e coagulase positivas, foram preparados inóculos com turbidez equivalente a 0,5 da escala de McFarland. Em seguida, com o auxílio de *swabs* estéreis estes inóculos foram semeados, em três direções, em placas de ágar Mueller Hinton. A seguir discos contendo 30 µg de cefoxitina ou 1 µg de oxacilina foram colocados sobre os meios. Então, as placas foram incubadas em estufa regulada a 35°C ± 2°C por 24 horas. Após este período, foram realizadas as leituras dos diâmetros dos halos definidos e comparados aos critérios estabelecidos pelo CLSI vigente e expressos na Tab. 3.

**TABELA 3:** Critérios interpretativos de halos de inibição dos discos de oxacilina e cefoxitina para diagnóstico laboratorial da resistência à oxacilina em *S. aureus*.

Antimicrobiano	Halo de Inibição (mm)		
	R	I	S
Oxacilina	≤ 10	11 – 12	≥ 13
Cefoxitina	≤ 21	-	≥ 22

Legenda: R – Resistente; I – Intermediária; S - Sensível

Fonte: CLSI 2009<sup>(56)</sup>

Resultados coincidentes de resistência à oxacilina e cefoxitina caracterizam cepas MRSA, enquanto sensibilidade à oxacilina e cefoxitina definem cepas MSSA.

### 3.4 Critérios de Inclusão e Exclusão

Como critérios de inclusão foram utilizadas cepas de *S. aureus* provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da FCMSCSP, previamente isoladas e identificadas como MRSA ou MSSA e de exclusão cepas não identificadas como *S. aureus*.

### 3.5 Inóculos

O preparo dos inóculos seguiu o método de suspensão direta das colônias recomendado pelo CLSI. As cepas de *S. aureus*, previamente isoladas e identificadas, foram semeadas em ágar Mueller Hinton e incubadas em estufa regulada a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 18 a 24 horas. A partir de colônias diretas foram preparadas as suspensões bacterianas em solução salina estéril. Estas suspensões foram ajustadas para atingir um nível de turbidez equivalente a 0,5 McFarland, correspondente a  $1,5 \times 10^8$  UFC/mL. O ajuste foi realizado, cuidadosamente, através de comparações visuais entre a suspensão de inóculo e um padrão da escala de 0,5 McFarland produzido pela empresa Probac do Brasil Produtos Bacteriológicos Ltda. Após acertar as suspensões dos inóculos, estas foram diluídas em solução salina estéril de 1:10 para obtenção de concentrações de  $10^7$  UFC/mL. Com a utilização do Replicador de Steers, o volume individual distribuído foi de aproximadamente  $2\mu\text{L}$ , portanto, a concentração final de cada um dos inóculos semeados na superfície do ágar correspondeu a cerca de  $10^4$  UFC/mL.

### 3.6 Diluição Seriada do Extrato de Própolis

A partir do extrato etanólico de própolis foram realizadas as diluições seriadas utilizando água purificada estéril como diluente. Volumes iguais de água e do extrato foram medidos e homogeneizados, resultando na primeira diluição (1:2). A seguir, volumes iguais das soluções obtidas e dos diluentes foram repetidamente preparados até a diluição de 1:128. A Tab. 4 exemplifica o procedimento utilizado para a obtenção das diluições seriadas.

**TABELA 4:** Método de diluição seriada do extrato de própolis

<b>Diluição</b>	<b>Volume da Amostra / Diluição</b>	<b>Volume do Diluyente (mL)</b>	<b>Concentração de extrato seco da própolis por placa (<math>\mu\text{g/mL}</math>)</b>
1:2	20 mL do Extrato Própolis	20	5700
1:4	20 mL Diluição 1:2	20	2850
1:8	20 mL Diluição 1:4	20	1420
1:16	20 mL Diluição 1:8	20	710
1:32	20 mL Diluição 1:16	20	350
1:64	20 mL Diluição 1:32	20	175
1:128	20 mL Diluição 1:64	20	85



### 3.7 Diluição Seriada do Álcool Etilico Neutro

A partir de uma solução do álcool etílico neutro a 73% foram realizadas as diluições seriadas utilizando água purificada estéril como diluente. Volumes iguais de água e álcool foram medidos e homogeneizados resultando na primeira diluição (1:2). A seguir, volumes iguais das soluções obtidas e dos diluentes foram repetidamente preparados até a diluição de 1:8. A Tab. 5 descreve o procedimento usado para a obtenção das diluições seriadas.

**TABELA 5:** Método de diluição seriada do álcool etílico neutro a 73%

<b>Diluição</b>	<b>Volume da Amostra / Diluição</b>	<b>Volume do Diluente (mL)</b>	<b>Concentração do álcool por placa (mg/mL)</b>
1:2	20 mL do álcool	20	18,25
1:4	20 mL diluição 1:2	20	9,12
1:8	20 mL diluição 1:4	20	4,56

### 3.8 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

O método de diluição em ágar para a determinação da susceptibilidade antimicrobiana é uma técnica bem estabelecida. O agente antimicrobiano é incorporado, em diferentes concentrações, no meio de cultura. Os inóculos podem

ser semeados, rápido e simultaneamente, nas superfícies dos meios com a utilização de um aparato denominado Replicador de Steers, capaz de transferir 32 inóculos em cada placa<sup>(57)</sup>.

De acordo com o CLSI, o meio de ágar Mueller Hinton é considerado o melhor meio de cultura para testes de susceptibilidade, tendo sido por este motivo selecionado para a realização deste trabalho<sup>(57)</sup>.

A partir da base de Mueller Hinton desidratada, o meio foi preparado segundo as recomendações do fabricante (Himedia®). Após a dissolução e homogeneização do meio, foram distribuídos 19 mL em frascos de vidro e em seguida autoclavados a 121 °C por 15 minutos. Quando a temperatura do meio de cultura atingiu de 45 °C a 50 °C, foram adicionados, assepticamente, 1,0 mL das diluições seriadas do extrato de própolis ou 1 mL das diluições seriadas de álcool etílico para controle ou 1 mL de água purificada estéril para controle de crescimento das cepas analisadas. Em seguida, os meios suplementados foram homogeneizados e vertidos assepticamente sobre placas de Petri de 90 mm, estéreis e identificadas. As placas permaneceram, sob temperatura ambiente, em superfícies lisas e niveladas até a solidificação do meio de cultura.

Após a solidificação do meio de cultura, as placas foram acondicionadas em embalagens plásticas e armazenadas em geladeira com temperatura regulada entre 2 °C e 8 °C, por um período de 5 a 15 dias.

Para garantir a estabilização da temperatura das placas à temperatura ambiente e deixar a superfície do ágar seca, as placas contendo os meios de cultura foram retiradas da geladeira e deixadas semi-abertas sob fluxo laminar por aproximadamente 30 minutos, antes de sua utilização.

A estabilidade do agente antimicrobiano foi avaliada com a inoculação de cepas ATCC (*American Type Culture Collection*) de *S. aureus* (MSSA - 29213 e MRSA - 33511) simultaneamente a todas as análises realizadas.

Os tubos, contendo as suspensões bacterianas ajustadas a concentrações de  $10^7$  UFC/mL, foram numerados e acondicionados sequencialmente em estantes.

Imediatamente após a homogeneização de cada um dos inóculos e com o uso de pipetador automático e ponteiros descartáveis, volumes correspondentes a 350  $\mu$ L foram distribuídos nos respectivos poços da placa de inoculação do Replicador.

Para avaliar a reprodutibilidade do método, cepas ATCC de *S. aureus* (MSSA - 29213 e MRSA - 33511) foram inoculadas, simultaneamente, a todas as análises realizadas e as cepas identificadas de 1 a 30 foram avaliadas em duplicata (correspondente a 14,3 % das amostras estudadas).

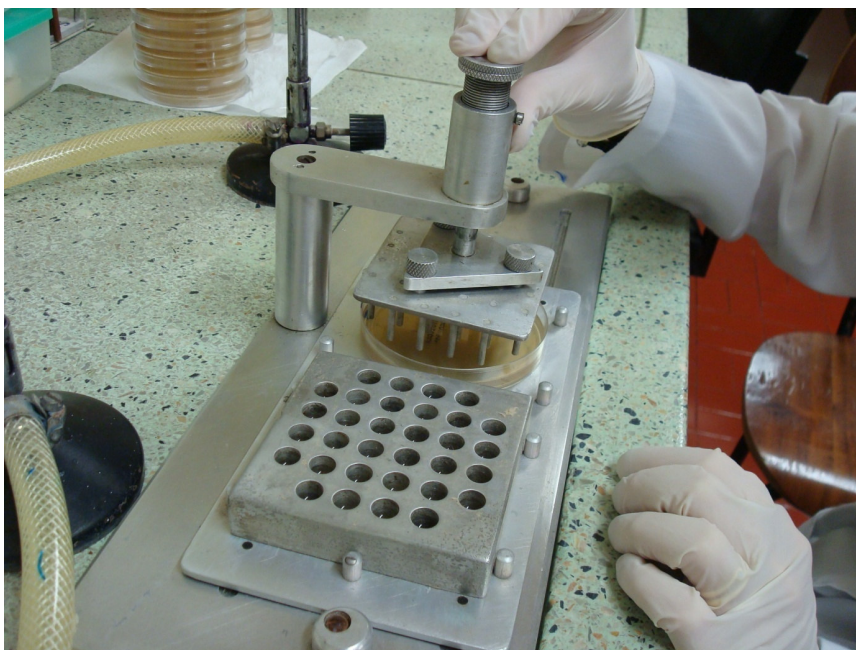
O procedimento para a inoculação foi baseado no método desenvolvido e descrito por Steers *et al* (1959)<sup>(58)</sup>. As placas contendo o meio de cultura foram marcadas para definir a orientação da inoculação e garantir a identificação das cepas analisadas. As inoculações foram iniciadas com placas sem adição do agente antimicrobiano (brancos) para avaliar a viabilidade das cepas seguindo-se em ordem crescente de concentração das placas contendo diluições do extrato de própolis. Por fim, uma segunda placa de promoção de crescimento foi inoculada para assegurar a ausência de contaminação ou carregamento significativo do agente antimicrobiano durante as inoculações realizadas.

Para avaliar a interferência ou possível ação antimicrobiana do álcool etílico presente nas diluições 1:2, 1:4 e 1:8, aproximadamente 43% das cepas analisadas

foram inoculadas, seguindo a mesma metodologia descrita anteriormente, em placas contendo ágar Mueller Hinton e soluções hidroalcoólicas incorporadas. Nestes casos, também foram inoculadas placas sem adição da solução (brancos) para avaliar a viabilidade das cepas, seguindo-se em ordem crescente de concentração das placas contendo diluições do álcool. Após este procedimento, uma segunda placa de promoção de crescimento foi inoculada pelos mesmos motivos já expressos.

As placas inoculadas permaneceram sob temperatura ambiente até a absorção das suspensões bacterianas no ágar, aproximadamente por dez minutos. Então as placas foram invertidas e incubadas em estufa regulada a  $35^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$  por 24 horas.

A menor concentração do agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento microbiano por completo foi definida como a CIM.



**FIGURA 2:** Inoculação através do Replicador de Steers.

### **3.9 Tratamento Estatístico**

Os resultados deste trabalho não são compatíveis com tratamentos estatísticos, pois os dados são únicos, não sendo aplicável compará-los com outros antimicrobianos para avaliar a significância dos valores obtidos.

### **3.10 Pesquisa Experimental**

Este trabalho foi submetido à avaliação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da ISCMSP sendo aprovado sob a identificação Projeto n° 153/08.

### **3.11 Levantamento Bibliográfico**

O levantamento da literatura foi realizado nas bases de dados Medline, Lilacs, Google e Cochrane. Os descritores utilizados foram: “própolis”, “aureus and colonization” e “aureus and resistance”. Para o refinamento das buscas os limites definidos foram: textos em inglês, espanhol e português e artigos publicados após 1998. Referências adicionais também foram identificadas através das referências de artigos relevantes.

**RESULTADOS**

---

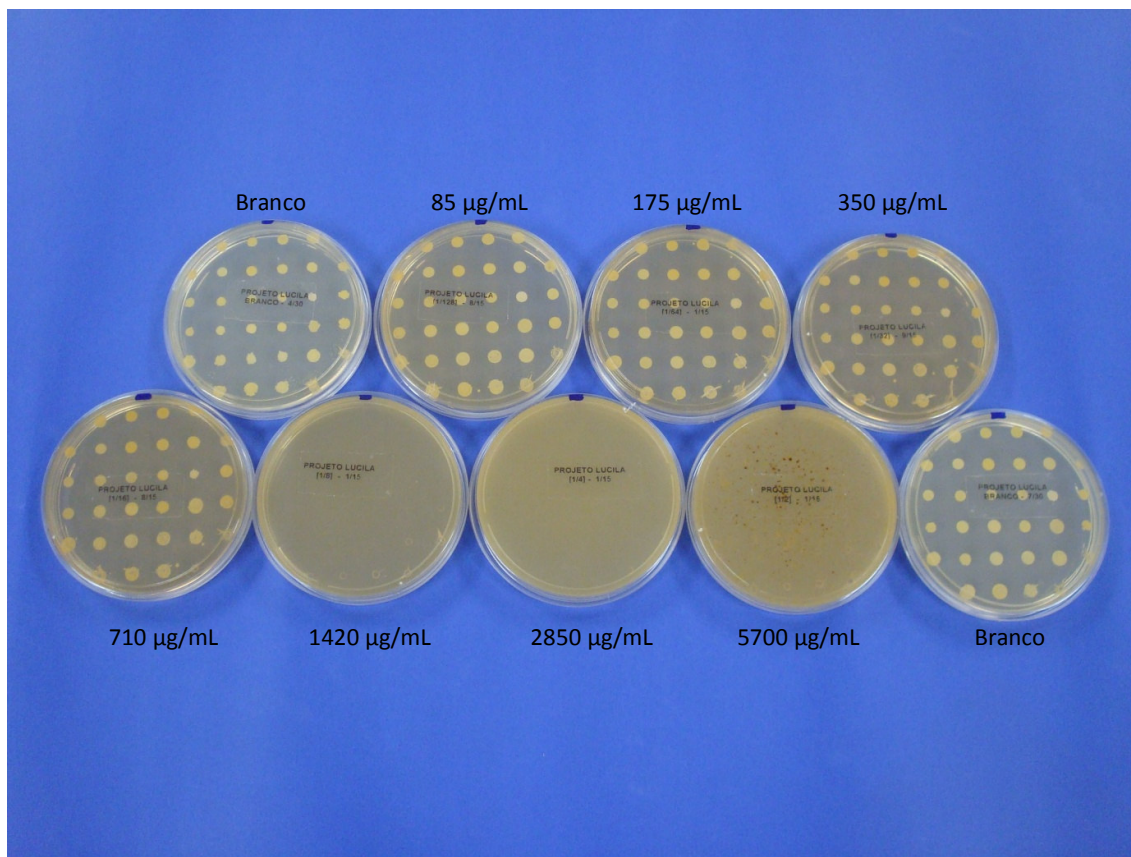
## 4. RESULTADOS

### 4.1 Concentração Inibitória Mínima

Os resultados encontrados para as CIM do EEP foram entre 710 µg/mL e 2850 µg/mL. Considerando as 210 cepas incluídas no estudo a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> obtidas foram coincidentes e equivalem a 1420 µg/mL.

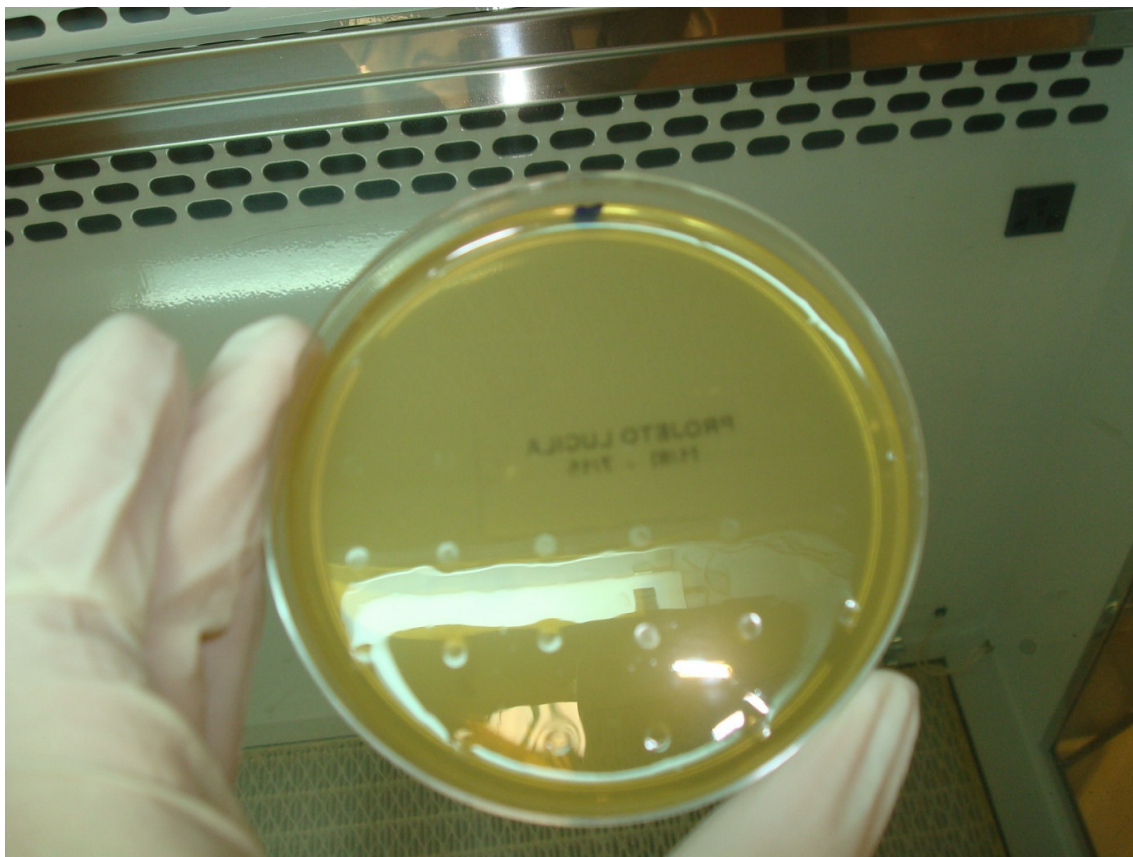
A inoculação de cepas ATCC de *S. aureus* (MSSA - 29213 e MRSA - 33511) em todas as análises realizadas para a determinação da CIM do EEP, avaliação da estabilidade do agente antimicrobiano e reprodutibilidade do método apresentaram resultados idênticos em todos os testes. As CIM obtidas foram de 1420 µg/mL para ambas as cepas ATCC.

A avaliação das cepas 1 a 30 em duplicata também apresentou resultados coincidentes.



**FIGURA 3:** Série completa para a determinação da CIM do EEP conforme sequência de inoculação (Cepas números 193 a 224).



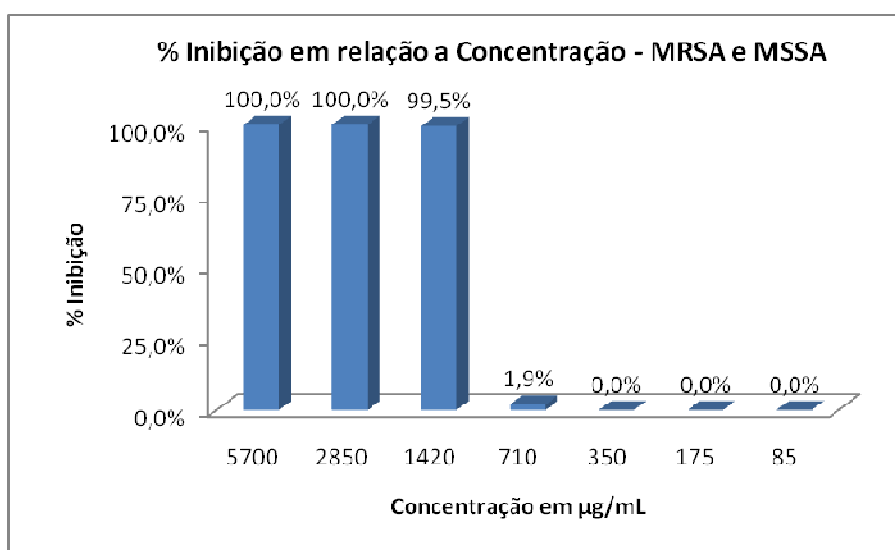


**FIGURA 4:** Evidências das inoculações sem a presença do crescimento microbiano (Diluição 1:8 – Cepas números 1 a 32).

Para facilitar a visualização dos valores obtidos foram elaboradas tabelas e gráficos com os percentuais de inibição considerando as 210 cepas incluídas no estudo (Tab. 6, Gráf. 2), resultados encontrados para as cepas MSSA (Tab. 7, Gráf. 3) e MRSA (Tab. 8, Gráf. 4) separadamente. Os resultados integrais obtidos no estudo e as referências numéricas das cepas estão expressos no Anexo 3.

**TABELA 6:** Resultados das CIM do EEP frente a cepas MSSA e MRSA (n=210) provenientes do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da FCMSCSP, março de 2009.

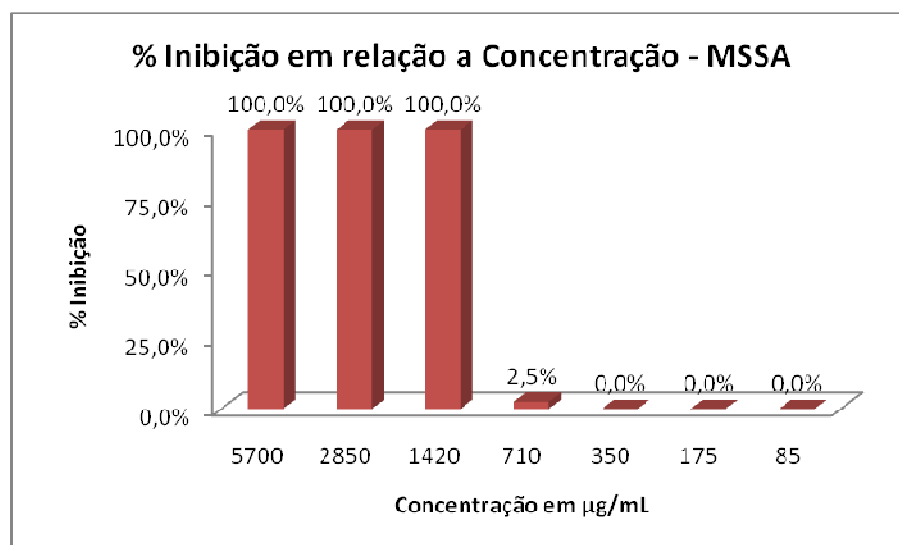
Total de Cepas	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	2850
205	1420
4	710



**GRÁFICO 2:** Distribuição percentual dos resultados de inibição de crescimento, segundo as diluições efetuadas do EEP, frente a cepas de MSSA e MRSA (n=210) provenientes do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da FCMSCSP, março de 2009.

**TABELA 7:** Resultados das CIM do EEP frente a cepas MSSA (n=162) provenientes do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da FCMSCSP, março de 2009.

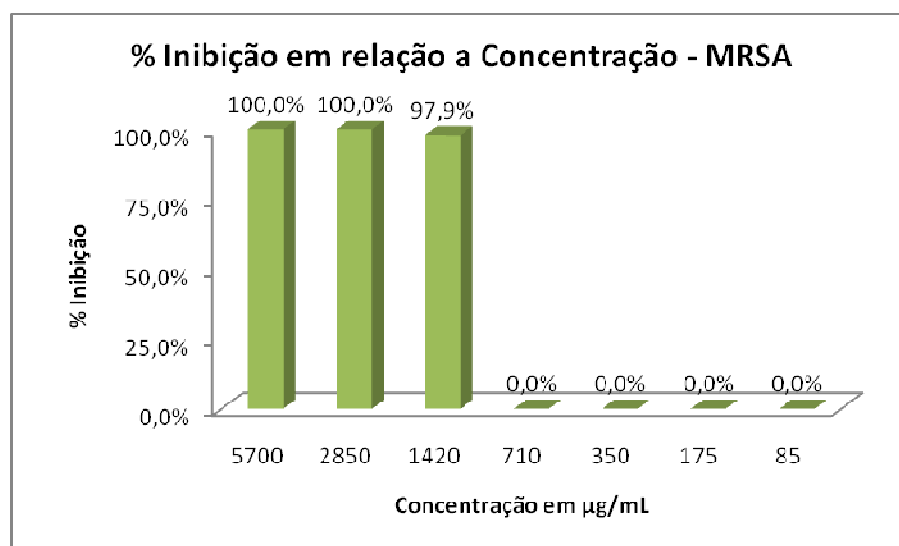
Total de Cepas	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )
158	1420
4	710



**GRÁFICO 3:** Distribuição percentual dos resultados de inibição de crescimento, segundo as diluições efetuadas do EEP, frente a cepas de MSSA (n=162) provenientes do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da FCMSCSP, março de 2009.

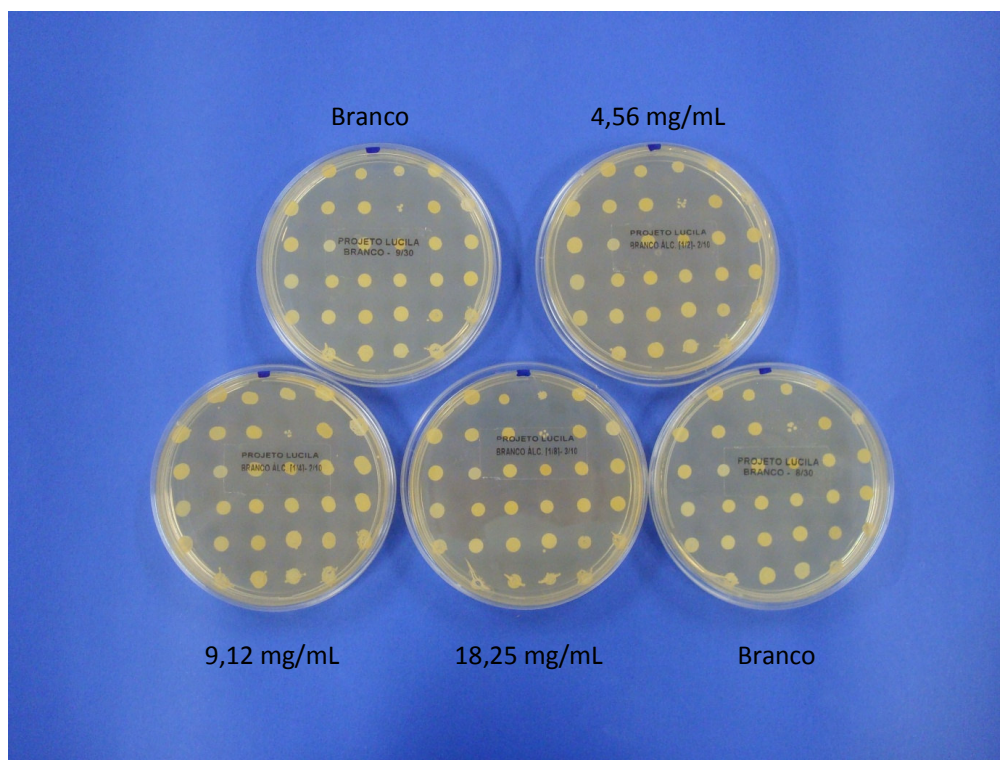
**TABELA 8:** Resultados das CIM do EEP frente a cepas MRSA (n=48) provenientes do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da FCMSCSP, março de 2009.

Total de Cepas	CIM ( $\mu\text{g/mL}$ )
1	2850
47	1420



**GRÁFICO 4:** Distribuição percentual dos resultados de inibição de crescimento, segundo as diluições efetuadas do EEP, frente a cepas de MRSA (n=48) provenientes do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da FCMSCSP, março de 2009.

As placas contendo concentrações de 18,25 mg/mL, 9,12 mg/mL e 4,56 mg/mL de álcool etílico inoculadas e incubadas (amostras números 129 a 224) para avaliar a interferência ou possível ação antimicrobiana do álcool etílico presente no extrato de própolis apresentaram crescimento microbiano (Anexo 4).



**FIGURA 5:** Série completa para a avaliação da ação do álcool etílico conforme sequência de inoculação (Cepas números 193 a 224).

## 4.2 Tipificação da Própolis

A análise cromatográfica da própolis *in natura* e o seu respectivo extrato etanólico envolvido no estudo detectou e quantificou compostos químicos conforme descritos nas Tabs. 9 e 10, respectivamente.

**TABELA 9:** Perfil cromatográfico da própolis *in natura*

<b>Composto Químico</b>	<b>Média (mg/g)</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Média (%)</b>	<b>Desvio padrão</b>
Ácido 3-[4-hidroxi-3-(oxobutenil)-fenilacrílico	3,355	0,053	0,335	0,005
Ácido 3-prenil-3(E)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenilcinâmico	0,119	0,009	0,012	0,001
Ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi)cinâmico	0,698	0,025	0,070	0,002
Ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxicinâmico	0,211	0,004	0,021	0,000
Diidrocanferida	0,312	0,005	0,031	0,000
Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	1,891	0,013	0,189	0,001
Ácido cafeico	0,292	0,001	0,029	0,000
Ácido cafeoilquinico 1	0,555	0,680	0,055	0,068
Ácido cafeoilquinico 2	0,684	0,564	0,068	0,056
Ácido cafeoilquinico 3	1,357	1,554	0,136	0,155
Ácido cafeoilquinico 4	2,491	0,000	0,249	0,000
Ácido cafeoilquinico 5	0,426	0,002	0,043	0,000
Ácido cinâmico	8,084	0,138	0,808	0,014
Ácido p-cumárico	10,201	0,909	1,201	0,091
Canferida	4,511	0,073	0,451	0,007
Canferol	0,528	0,025	0,053	0,002
Betuletol	4,175	0,029	0,417	0,003
2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano	4,093	0,002	0,409	0,000
Ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico	1,639	0,052	0,164	0,005
Ácido (E)-3-{4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3)-dihidrocinamoiloxi-3-metil-2-butenil]-5-prenilfenil-2-propenóico	1,710	0,019	0,171	0,002
Ácido 3,4-diidroxi-5-prenilcinâmico	1,486	0,030	0,149	0,003
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico	19,627	0,428	1,963	0,043
<b>Total</b>	<b>68,446</b>		<b>6,84</b>	

Fonte: Laboratório de Produtos Naturais do Programa de Mestrado de Farmácia da Uniban

**TABELA 10:** Perfil cromatográfico do EEP

<b>Composto Químico</b>	<b>Média (mg/mL)</b>	<b>Desvio padrão</b>	<b>Média (%)</b>	<b>Desvio padrão</b>
2,2-Dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano	2,612	0,056	0,261	0,006
Ácido (E)-3-[4-hidroxi-3-[(E)-4-(2,3)-dihidrocinamoiloxi-3-metil-2-butenil]-5-prenilfenil-2-propenóico	0,580	0,545	0,058	0,054
Ácido 3,4-diidroxi-5-prenilcinâmico	0,769	0,313	0,077	0,031
Ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico	11,525	0,078	1,152	0,008
Ácido 3-[4-hidroxi-3-(oxobutenil)-fenilacrílico	0,855	0,014	0,085	0,001
Ácido 3-prenil-3(E)-(4-hidroxi-3-metil-2-butenil)-5-prenilcinâmico	0,662	0,002	0,066	0,000
Ácido 3-prenil-4-(2-metilpropioniloxi)cinâmico	0,185	0,016	0,018	0,002
Ácido 3-prenil-4-diidrocinamoiloxicinâmico	0,200	0,000	0,020	0,000
Ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico	3,239	0,090	0,324	0,010
Ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico	1,019	0,002	0,102	0,000
Ácido cafeico	0,125	0,006	0,012	0,001
Ácido cafeoilquinico (1)	0,364	0,007	0,036	0,001
Ácido cafeoilquinico (2)	0,081	0,023	0,008	0,002
Ácido cafeoilquinico (3)	0,632	0,004	0,063	0,000
Ácido cafeoilquinico (4)	0,087	0,000	0,009	0,000
Ácido cinâmico	3,484	0,010	0,348	0,001
Ácido p-cumárico	5,081	0,091	0,508	0,010
Betuletol	1,441	1,695	0,144	0,169
Canferida	1,248	0,029	0,125	0,003
Canferol	0,372	0,000	0,037	0,000
Diidrocanferida	0,341	0,018	0,034	0,002
<b>Total</b>	<b>34,903</b>		<b>3,490</b>	

Fonte: Laboratório de Produtos Naturais do Programa de Mestrado de Farmácia da Uniban

**DISCUSSÃO**

---



## 5. DISCUSSÃO

### 5.1 Concentração Inibitória Mínima

Os resultados da CIM do EEP determinados no trabalho para as 210 cepas incluídas variaram da concentração de 710 a 2850  $\mu\text{g}$  de extrato seco da própolis / mL do meio. Avaliando somente as cepas sensíveis (MSSA) esta variação foi de 710 a 1420  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , enquanto que para as cepas resistentes (MRSA) 710 a 2850  $\mu\text{g}/\text{mL}$ , conforme Tabs. 7 e 8, respectivamente.

Todas as placas contendo as diluições seriadas do álcool etílico inoculadas apresentaram crescimento microbiano, evidenciando que nestas concentrações o álcool não possui ação antimicrobiana frente às cepas de *S. aureus* testadas.

Para comparação dos valores obtidos da CIM do EEP frente aos resultados contidos na literatura foi elaborada a Tab. 11. Os dados verificados neste trabalho estão expressos nas duas primeiras linhas seguidos de dados da literatura. Nota-se que os valores expressos são bem variáveis. As metodologias utilizadas nesses trabalhos são diferentes e os valores não apresentam similaridade, mesmo entre estudos com métodos semelhantes. Tais variações dos valores de CIM obtidos entre esses estudos podem estar relacionadas a diferenças metodológicas, variabilidade das cepas ou das amostras de própolis utilizadas nos diversos trabalhos.

Além disso, há uma falta de dados padronizados nos trabalhos publicados na literatura como valores expressos somente em percentagens sem as informações necessárias para as conversões em  $\mu\text{g}$  de extrato seco da própolis / mL do meio.

Ao comparar os resultados deste estudo com os dados da literatura, observa-se que para as metodologias de diluição em ágar ou macrodiluição os valores obtidos são semelhantes entre amostras de diferentes procedências como Brasil, Itália e Croácia. Entretanto, amostras de extratos etanólicos de própolis provenientes da Turquia apresentam resultados inferiores tanto com a metodologia de diluição em ágar quanto na macrodiluição.

Com relação à metodologia de microdiluição utilizada em alguns estudos os valores de CIM apresentados são muito variáveis, de 1,6 µg/mL a 6,5 mg/mL. Mesmo considerando amostras de mesmas procedências e com cepas padronizadas (ATCC 25923).

As CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para as 210 cepas utilizadas no trabalho são coincidentes entre si e correspondem a 1420 µg/mL. Analisando as cepas MSSA e MRSA, individualmente, estes valores também são equivalentes. Tal fato demonstra que mesmo tratando-se de cepas com características diversas, como resistências a antimicrobianos, a ação inibitória frente ao EEP foi semelhante, ou seja, o mecanismo de resistência à meticilina não interfere na atividade antimicrobiana da própolis.

Assim, o resultado obtido da CIM do EEP confirma uma avaliação antimicrobiana em relação às cepas de *S. aureus* testadas conforme descrito na literatura e já apresentado neste trabalho.

**TABELA 11:** Valores de CIM determinados em estudos conduzidos com cepas de *S. aureus* e amostras de extratos etanólicos de própolis provenientes de diferentes regiões do mundo

Micro-organismo	N° Cepas	N° EEP	Proveniência	CIM <sub>50</sub> (µg/mL)	CIM <sub>90</sub> (µg/mL)	CIM (µg/mL)	Método
<i>S. aureus</i> (MSSA)	162	1	Brasil	1420	1420	710 – 1420	Diluição em Agar
MRSA	48	1	Brasil	1420	1420	710 – 2850	Diluição em Agar
<i>S. aureus</i>	118	1	Brasil	870	1200	ND (~1940)	Diluição em Agar <sup>(59)</sup>
<i>S. aureus</i>	5	1	Turquia	117	117	ND (~234)	Diluição em Agar <sup>(60)</sup>
<i>S. aureus</i>	5	1	Turquia	234	234	ND (~468)	Diluição em Agar <sup>(60)</sup>
<i>S. aureus</i>	5	1	Turquia	234	468	ND (~468)	Diluição em Agar <sup>(60)</sup>
<i>S. aureus</i>	61	2	Brasil	ND	ND	< 1100	Diluição em Agar <sup>(61)</sup>
<i>S. aureus</i>	35	1	Itália	1250	1250	620 – 2500	Diluição em Agar <sup>(37)</sup>
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	1	1	Brasil	ND	ND	360 – 3650	Macrodiluição <sup>(62)</sup>
<i>S. aureus</i> (ATCC 6538)	1	1	Brasil	ND	ND	440 – 2100	Macrodiluição <sup>(62)</sup>
<i>S. aureus</i>	1	4	Turquia	ND	ND	8 – 16	Macrodiluição <sup>(25)</sup>
MSSA	10	1	Croácia	ND	ND	890	Macrodiluição <sup>(20)</sup>
MSSA	10	1	Croácia	ND	ND	5680	Macrodiluição <sup>(20)</sup>
MSSA	10	1	Croácia	ND	ND	650	Macrodiluição <sup>(20)</sup>

Continuação

<b>Micro-organismo</b>	<b>N° Cepas</b>	<b>N° EEP</b>	<b>Proveniência</b>	<b>CIM<sub>50</sub> (µg/mL)</b>	<b>CIM<sub>90</sub> (µg/mL)</b>	<b>CIM (µg/mL)</b>	<b>Método</b>
MRSA	10	1	Croácia	ND	ND	1190	Macrodiluição <sup>(20)</sup>
MRSA	10	1	Croácia	ND	ND	4980	Macrodiluição <sup>(20)</sup>
MRSA	10	1	Croácia	ND	ND	1060	Macrodiluição <sup>(20)</sup>
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	1	11	Brasil	ND	ND	1,6 – 52,4	Microdiluição <sup>(31)</sup>
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	1	1	Bulgária	ND	ND	102,4	Microdiluição <sup>(63)</sup>
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	1	1	Brasil	ND	ND	1638	Microdiluição <sup>(63)</sup>
MRSA	1	1	Bulgária	ND	ND	409,6	Microdiluição <sup>(63)</sup>
MRSA	1	1	Brasil	ND	ND	6534	Microdiluição <sup>(63)</sup>
<i>S. aureus</i>	1	9	Taiwan	ND	ND	< 3,75 – 60	<i>Pour plate</i> <sup>(64)</sup>

As variabilidades de composição química das diferentes própolis, já discutidas anteriormente, são características favoráveis para atuação como agente antimicrobiano e descolonizante, já que evita o desenvolvimento de mecanismos de resistência pelos micro-organismos.

Pacientes com doenças crônicas, como a dermatite atópica e a fibrose cística, que utilizam antibióticos com muita frequência para controlar as infecções recorrentes, poderiam se beneficiar das ações antimicrobianas da própolis. Assim como os pacientes com queimaduras, conforme já citado, pois a própolis age como cicatrizante, anestesiante e antibiótico, atividades importantes para recuperação da área queimada.

Estudos de sinergismo da própolis com antimicrobianos mostraram resultados satisfatórios frente a cepas bacterianas, inclusive multirresistentes, conforme já citados neste trabalho. Estas características reforçam a tese de que a ação antimicrobiana da própolis deve ser objeto de novos estudos e propostas para uso clínico, pois pode permitir a redução da dose do antibiótico selecionado, promovendo melhora no quadro clínico do paciente e redução de custos no tratamento.

Além disso, estudos *in vitro* investigaram a atuação da própolis sobre fatores de virulência presentes em bactérias Gram positivas. Alguns compostos presentes nos extratos de própolis como flavonóides, ácidos caféico, benzóico e cinâmico provavelmente atuam na membrana ou parede celular causando danos funcionais e estruturais. Com relação aos fatores de virulência dos *Staphylococcus* spp e a atuação de EEP, estudos demonstraram que a coagulase é completamente suprimida na presença da própolis e a ação da lipase é fortemente reduzida além de uma

evidente prevenção dose-dependente da formação de biofilmes por cepas de *Staphylococcus* spp<sup>(37)</sup>. Sendo assim, poderiam ser desenvolvidos estudos apropriados para a avaliação da ação desinfetante da própolis frente a dispositivos médicos.

No mercado nacional e internacional há inúmeros produtos a base de própolis como: extratos alcoólicos, *sprays* para uso oral e nasal, cápsulas, cremes, sabonetes, cremes dentais, entre outros.

De acordo com a ANVISA, para o registro de produtos com indicação terapêutica que contenham própolis como ingrediente ativo, devem ser atendidos os requisitos da Resolução RDC n°132 de 29 de Maio de 2003, dentre os quais estão a comprovação de eficácia e de segurança de uso, bem como a apresentação e atendimento a requisitos mínimos de identidade e qualidade validados para possibilitar seu controle de qualidade<sup>(65)</sup>. Da mesma forma, diversos órgãos reguladores internacionais deveriam exigir a padronização química da própolis para garantir sua qualidade, eficácia e segurança<sup>(5)</sup>, uma vez que aprovam este produto com finalidade farmacêutica.

Devido à demanda pelo registro de produtos com indicação terapêutica, contendo, como ativo, própolis, isolada ou em associação a ANVISA elaborou uma Nota Técnica sobre o Registro de Produtos Contendo Própolis em 2005.

Esta define que os requisitos de registro estão expressos na RDC nº 132 de 29 de Maio de 2003, enquanto que a nota técnica abrange itens para a comprovação de segurança e eficácia, além de requisitos mínimos de identidade e qualidade validados, entre eles, a evidência da presença de marcadores que comprovem a

origem da própolis. Sendo aplicável a produtos que contenham própolis e que apresentem indicação terapêutica, nacionais ou importados<sup>(66)</sup>.

Nela consta que para a comprovação de eficácia e segurança para produtos de uso tópico com as seguintes indicações de uso: anti-inflamatório, anti-séptico e cicatrizante, não serão exigidos estudos de comprovação de eficácia. Para outras indicações não derivadas de uso tradicional e para associações que envolvam própolis e extratos vegetais (ativos), deverá ser apresentado: comprovação clínica (Fase III) do efeito terapêutico e da segurança de uso para a própolis específica que é utilizada no produto ou na associação; ou a comprovação da eficácia e da segurança de uso. As comprovações também poderão ser apresentadas por meio de literatura científica indexada em bases de dados com estudos realizados com a própolis específica objeto do produto a ser registrado<sup>(66)</sup>.

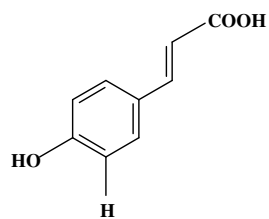
## **5.2 Tipificação da Própolis**

Atualmente, a maioria das publicações relacionadas às atividades biológicas da própolis incluem a caracterização química da amostra utilizada<sup>(22)</sup>. A importância da tipificação das amostras de própolis e quantificação dos seus componentes bioativos presentes é sua caracterização, e a consequente possibilidade de emprego desta amostra como matéria-prima para a produção de produtos farmacêuticos, cosméticos e de higiene oral<sup>(29)</sup>, podendo ser utilizado um tipo específico de própolis para uma determinada atividade.

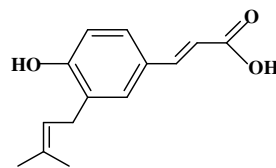
A própolis brasileira pode ser classificada de acordo com a presença de marcadores químicos principais. Esta tipificação é relacionada com a região geográfica da coleta de resina vegetal pelas abelhas. A própolis brasileira pode ser agrupada em quatro tipos: BRG, BRP(PR) , BRP(SP/MG) e BRPG, conforme já apresentado previamente.

Analisando a composição química da amostra da própolis utilizada neste trabalho e o seu respectivo extrato etanólico concluiu-se que se trata de uma mistura de própolis tipos BRP(SP/MG) e BRP(PR), sendo que as amostras possuem todos os marcadores definidos para ambos os tipos e estão descritos na Fig. 6.

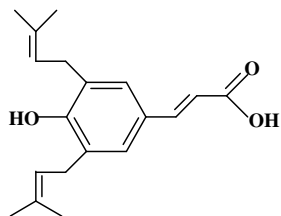




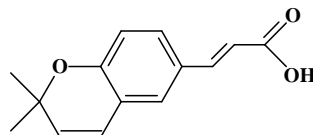
(ácido p-cumárico)



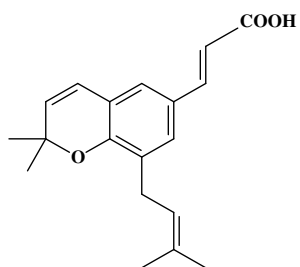
(ácido 3-prenil-4-hidroxicinâmico)



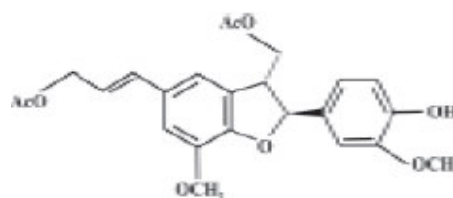
(ácido 3,5-diprenil-4-hidroxicinâmico)



(2,2-dimetil-6-carboxietenil-2H-1-benzopirano)



(ácido 2,2-dimetil-8-prenil-2H-1-benzopirano-6-propenóico)



(ácido caféico)

**FIGURA 6:** Estruturas químicas dos marcadores presentes na amostra tipificada como BRP(PR) e BRP(SP/MG).

**CONCLUSÕES**

---

## 6. CONCLUSÕES

- Frente às 210 cepas de *S. aureus* utilizadas no trabalho o EEP apresentou atividade antimicrobiana, com CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> coincidentes e equivalentes a 1420 µg/mL.
- De acordo com a composição química obtida da amostra da própolis *in natura* e o seu respectivo extrato etanólico concluiu-se que se trata de uma mistura de própolis tipos BRP(SP/MG) e BRP(PR), pois as amostras possuem todos os marcadores definidos para ambos os tipos.



## 7. ANEXOS

### Anexo 1: Laudo Técnico do Extrato Etanólico de Própolis Novo Mel®

#### NOVO MEL

Novo Mel Ind. e Com. Exterior Ltda. ME  
 Rua Comendador Elias Assi, 96  
 Tel: 55 11 3721 5693  
 e-mail: novome@novomel.com.br  
 CNPJ 00 596 942/0001-81  
 IE 114 404 590 112

Leia nossa HOME PAGE  
[www.novomel.com.br](http://www.novomel.com.br)

### LAUDO TÉCNICO DO EXTRATO DE PRÓPOLIS

**Produto:** EXTRATO DE PRÓPOLIS MARROM

**Lote / Fab :** 180209

**Método de Produção:** Maceração / Percolação

**Val:** Fev./ 2011

**Solvente para Extração:** Álcool etílico neutro

**Lote de matéria Prima:** 005/08

<b>Características Sensoriais</b>	<b>Resultados Obtidos</b>
Aspecto	Límpido
Coloração	Marrom esverdeado
Sabor	Sabor forte e característico
Aroma	Aroma característico
<b>Características Físico-químicas</b>	
Extrato seco	22,8 %
Teor alcoólico	73 ° G. L.
<b>Testes de Qualidade</b>	
Índice de Oxidação	Reação positiva
Reação quantitativa dos compostos flavonóides	Reação positiva

Responsável:	<b>Dra. Beatriz Pamplona</b>
Laboratorista:	<b>Tec. Natália R. de Sá</b>

#### Referências:

MARCUCCI, Maria Cristina ; BANKOVA, V. "Standardization of Propolis: Present Status and Perspectives" , Bee World, Inglaterra, v. 81, n. 4, p. 182-188, 2000.

" Métodos de controle químico de amostras de propolis" Dissertação de Mestrado, Ricardo Gomide Woisky do Rio, Faculdade de Farmácia- USP , 1996 .  
 Novo Mel 2007. Todos os direitos reservados.

**Anexo 2:** Referência numérica das cepas utilizadas no trabalho com as respectivas identificações da Bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo e as classificações dos Micro-organismos.

<b>N°</b>	<b>N° Identificação Bacterioteca</b>	<b>Micro-organismo</b>
1	3045127	MSSA
2	3045114	MSSA
3	366	MSSA
4	3045126	MSSA
5	3045121	MSSA
6	3046709	MSSA
7	2986595	MSSA
8	2986598	MSSA
9	2986429 - 325	MSSA
10	2986435 - 329	MSSA
11	2986430 - 333	MSSA
12	2986506 - 308	MSSA
13	2986515 - 322	MSSA
14	2990459	MSSA
15	3046716	MSSA
16	2976879	MSSA
17	2907617 - 207	MRSA
18	2943377 - 218	MSSA
19	2943312 - 192	MRSA
20	494854 -151	MSSA
21	2746359 - 615	MSSA
22	2936885 - 161	MSSA
23	2936880 - 160	MSSA
24	2936877 - 153	MRSA
25	2621599 - 189	MSSA
26	2942276 - 200	MSSA
27	2621598 - 188	MSSA
28	500301 - 204	MSSA
29	2621596 - 187	MRSA
30	2936882 - 158	MSSA
31	ATCC 29213	MSSA
32	ATCC 33511	MRSA
33	2941752-139 R.1030687	MSSA
34	2941755 - 143 R.1107191	MRSA
35	2941763 - 146 R.869348	MSSA
36	2941753 - 147 R.1113713	MRSA

## Continuação

37	2941756 - 149 R.923136	MSSA
38	2941758 - 141 R.826736	MSSA
39	2934402 - 120 R.905933	MRSA
40	2934409 - 119 R.1016118	MRSA
41	2943375 - 210	MSSA
42	2943383 - 221	MSSA
43	2943455 - 172	MSSA
44	2936889 - 165	MSSA
45	499138 - 186	MSSA
46	294311 - 199	MRSA
47	2943378 - 220	MSSA
48	2621599 - 190	MRSA
49	345197 - 440	MSSA
50	3045199 - 432	MSSA
51	3045198 - 433	MSSA
52	2988646 - 435	MSSA
53	2988642 - 439	MSSA
54	5299999 - 444	MSSA
55	524820 - 392	MRSA
56	530006 - 443	MSSA
57	3045190 - 424	MSSA
58	3045189 - 425	MSSA
59	3045184 - 426	MSSA
60	2988643 - 436	MSSA
61	3045200 - 437	MSSA
62	3045196 - 429	MRSA
63	ATCC 29213	MSSA
64	ATCC 33511	MRSA
65	2943466 -179	MSSA
66	2936890 - 166	MSSA
67	2943463 - 180	MSSA
68	2943465 - 182	MSSA
69	2934401 - 121 R.879929	MSSA
70	2986574 - 320	MSSA
71	2986432 -327	MSSA
72	2928266 -169	MRSA
73	3045183 -422	MSSA
74	3045191 - 423	MSSA
75	2943380 - 224	MSSA
76	2928781 - 214	MSSA
77	3045181 - 416	MSSA
78	2986433 - 331	MSSA
79	3045182 - 418	MSSA
80	2990450 - 324	MRSA
81	2976869	MSSA

## Continuação

82	2976871	MSSA
83	518335	MSSA
84	2976883	MSSA
85	2976878	MRSA
86	2976873	MSSA
87	2976884	MSSA
88	2976885	MSSA
89	2976881	MSSA
90	2986579	MSSA
91	2986587	MSSA
92	2986585	MSSA
93	2986577	MSSA
94	3045715	MSSA
95	ATCC 29213	MSSA
96	ATCC 33511	MRSA
97	3046717	MSSA
98	3045166	MSSA
99	2943460 - 175	MSSA
100	2943458 - 177	MSSA
101	2976875	MSSA
102	2986572	MSSA
103	2986596	MSSA
104	511410	MRSA
105	2941618 - 231	MSSA
106	2943387 - 225	MRSA
107	2941628 - 240	MSSA
108	2928277 - 217	MSSA
109	2941615 - 215	MSSA
110	2943376 - 233	MSSA
111	2941624 - 233	MSSA
112	2941621 - 229	MSSA
113	3046713	MSSA
114	359	MRSA
115	2928800	MRSA
116	3001403	MSSA
117	2937680	MSSA
118	2899198 - 136	MSSA
119	3046711	MSSA
120	2989428	MSSA
121	2986589	MSSA
122	2943303 - 201	MSSA
123	500277 - 203	MSSA
124	2941614 - 216	MSSA
125	2943313 - 197	MSSA
126	2907655 - 205	MRSA



## Continuação

127	ATCC 29213	MSSA
128	ATCC 33511	MRSA
129	2894872 - 108	MSSA
130	2927560 - 95	MRSA
131	2899192 - 126	MSSA
132	2892282 - 133	MSSA
133	2936879 - 164	MSSA
134	2899200 - 134	MSSA
135	2895020 - 04	MRSA
136	2831563 - 10	MRSA
137	2895027 - 14	MSSA
138	2895017 - 05	MSSA
139	2831560 - 15	MSSA
140	474139 - 543	MSSA
141	2831815 - 456	MRSA
142	2895023 - 06	MSSA
143	2895024 - 08	MSSA
144	2894805 - 46	MSSA
145	2892296 - 41	MSSA
146	2892245 - 51	MRSA
147	2892242 R.770602	MSSA
148	2892239 - 50	MSSA
149	2892237 - 43	MSSA
150	2831562 - 9	MSSA
151	2879841 - 70	MSSA
152	2894864 - 106	MSSA
153	2879848 - 64	MSSA
154	2879847 - 68	MRSA
155	2879846 - 71	MSSA
156	2879843 - 69	MSSA
157	480729 - 55	MRSA
158	2879839 - 62	MSSA
159	ATCC 29213	MSSA
160	ATCC 33511	MRSA
161	858	MSSA
162	851	MRSA
163	854	MRSA
164	841	MRSA
165	175	MRSA
166	837	MRSA
167	846	MSSA
168	853	MSSA
169	171929	MRSA
170	171971	MRSA
171	182426	MSSA

## Continuação

172	182463	MSSA
173	182532	MSSA
174	184243	MSSA
175	186529	MSSA
176	170934	MRSA
177	173232	MSSA
178	173349	MSSA
179	173400	MSSA
180	174220	MSSA
181	173857	MSSA
182	176304	MSSA
183	177167	MSSA
184	178424	MSSA
185	172569	MSSA
186	172868	MSSA
187	172899	MSSA
188	173229	MSSA
189	172386	MSSA
190	172069	MSSA
191	ATCC 29213	MSSA
192	ATCC 33511	MRSA
193	171297	MSSA
194	171967	MSSA
195	171251	MSSA
196	171249	MSSA
197	171241	MSSA
198	170883	MSSA
199	170173	MSSA
200	169900	MSSA
201	176363	MRSA
202	178112	MRSA
203	182513	MRSA
204	185492	MRSA
205	172542	MRSA
206	173564	MRSA
207	173714	MRSA
208	173577	MRSA
209	186284	MRSA
210	186500	MRSA
211	187720	MRSA
212	2746479 - 499	MSSA
213	2746472 - 501	MSSA
214	2881068 - 316	MRSA
215	2879667 - 877	MSSA
216	2879666 - 910	MSSA

## Continuação

217	2927561 - 94	MRSA
218	2934408 - 124	MSSA
219	2894876 - 114	MSSA
220	2894870 - 98	MSSA
221	2894869 - 102	MSSA
222	2894866 - 107	MSSA
223	ATCC 29213	MSSA
224	ATCC 33511	MRSA

---

**Anexo 3:** Resultados da Concentração Inibitória Mínima para o Extrato Etanólico de Própolis (n=210)

N° Cepa	Branco	5700 µg/mL	2850 µg/mL	1420 µg/mL	710 µg/mL	350 µg/mL	175 µg/mL	85 µg/mL	Branco	Micro-organismo
1	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
2	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
3	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
4	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
5	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
6	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
7	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
8	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
9	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
10	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
11	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
12	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
13	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
14	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
15	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
16	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
17	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
18	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
19	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
20	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
21	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
22	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
23	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
24	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA

Continuação

25	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
26	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
27	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
28	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
29	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
30	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
31	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
32	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
33	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
34	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
35	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
36	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
37	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
38	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
39	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
40	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
41	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
42	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
43	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
44	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
45	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
46	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
47	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
48	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
49	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
50	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
51	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA

Continuação

52	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
53	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
54	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
55	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
56	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
57	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
58	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
59	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
60	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
61	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
62	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
63	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
64	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
65	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
66	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
67	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
68	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
69	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
70	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
71	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
72	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
73	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
74	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
75	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
76	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
77	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
78	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA

Continuação

79	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
80	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
81	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
82	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
83	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
84	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
85	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
86	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
87	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
88	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
89	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
90	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
91	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
92	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
93	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
94	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
95	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
96	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
97	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
98	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
99	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
100	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
101	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
102	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
103	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
104	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
105	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA

## Continuação

106	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
107	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
108	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
109	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
110	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
111	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
112	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
113	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
114	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
115	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
116	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
117	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
118	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
119	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
120	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
121	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
122	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
123	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
124	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
125	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
126	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
127	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
128	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
129	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
130	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
131	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
132	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA



Continuação

133	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
134	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
135	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
136	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
137	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
138	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
139	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
140	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
141	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
142	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
143	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
144	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
145	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
146	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
147	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
148	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
149	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
150	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
151	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
152	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
153	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
154	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
155	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
156	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
157	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
158	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
159	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA

Continuação

160	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
161	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
162	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
163	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
164	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
165	(+)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
166	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
167	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
168	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
169	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
170	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
171	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
172	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
173	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
174	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
175	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
176	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
177	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
178	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
179	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
180	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
181	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
182	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
183	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
184	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
185	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
186	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA

Continuação

187	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
188	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
189	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
190	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
191	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
192	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
193	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
194	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
195	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
196	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
197	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
198	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
199	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
200	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
201	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
202	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
203	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
204	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
205	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
206	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
207	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
208	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
209	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
210	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
211	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
212	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
213	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA

Continuação

214	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
215	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
216	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
217	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
218	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
219	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
220	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
221	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
222	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
223	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
224	(+)	(-)	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA

**Legendas:** (+) Crescimento Microbiano

(-) Ausência de Crescimento  
Microbiano

**Nota:** As cepas números 31, 63, 95, 127, 159, 191, 223 e números 32, 64, 96, 128, 160, 192 e 224 correspondem às cepas ATCC de MSSA e MRSA, respectivamente.

**Anexo 4: Resultados da interferência do Álcool Etílico Neutro**

<b>N° Cepa</b>	<b>Branco</b>	<b>18,25 mg/mL</b>	<b>9,12 mg/mL</b>	<b>4,56 mg/mL</b>	<b>Branco</b>	<b>Micro- organismo</b>
129	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
130	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
131	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
132	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
133	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
134	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
135	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
136	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
137	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
138	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
139	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
140	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
141	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
142	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
143	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
144	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
145	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
146	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
147	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
148	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
149	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
150	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
151	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
152	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
153	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
154	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
155	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
156	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
157	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
158	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
159	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
160	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
161	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
162	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
163	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
164	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
165	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
166	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
167	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA

Continuação

168	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
169	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
170	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
171	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
172	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
173	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
174	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
175	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
176	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
177	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
178	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
179	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
180	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
181	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
182	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
183	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
184	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
185	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
186	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
187	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
188	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
189	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
190	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
191	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
192	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
193	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
194	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
195	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
196	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
197	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
198	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
199	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
200	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
201	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
202	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
203	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
204	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
205	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
206	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
207	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
208	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
209	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
210	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA

Continuação

211	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
212	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
213	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
214	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
215	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
216	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
217	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA
218	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
219	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
220	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
221	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
222	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
223	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MSSA
224	(+)	(+)	(+)	(+)	(+)	MRSA

**Legendas:**(+)  
(+) Crescimento Microbiano(-)  
(-) Ausência de Crescimento Microbiano

**Nota:** As cepas números 159, 191, 223 e números 160, 192 e 224 correspondem às cepas ATCC de MSSA e MRSA, respectivamente.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---



## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Murray PR, editor. Manual of clinical microbiology. 9ª Ed. Washington: Asm Press;2007. p. 390-411.
- 2 Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico. 5ª Ed. Rio de Janeiro: Medsi;2001. p.551-88.
- 3 Trabulsi LR, Alterthum F, editores. Microbiologia. 4ª Ed. São Paulo: Atheneu;2005. p. 175-182.
- 4 Almeida AC, Menezes H. Anti-inflammatory activity of propolis extracts: a review. J Venom Anim Toxins. [periódico online] 2002; [citado 08 janeiro 2009];8(2). Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S010104-79302002000200002](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010104-79302002000200002)
- 5 Lustosa SR, Galindo AR, Nunes LCC, Randau KP, Rolim Neto PJ. Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. Rev Bras Farmacog. 2008 Jul-Set;18(3): 447-54.
- 6 Auricchio MT, Bugno A, Almodóvar AAB, Pereira TC. Avaliação da atividade antimicrobiana de preparações de própolis comercializadas na cidade de São Paulo. Rev Inst Adolfo Lutz. 2006;65(3): 209-12.
- 7 Funari CS, Ferro VO. Análise de própolis. Cienc Tecnol Aliment. 2006 Jan-Mar;26(1).
- 8 Salatino A, Teixeira EW, Negri G, Message D. Origin and chemical variation of brazilian propolis. Evid Based Complement Alternat Med. 2005 Mar;2(1): 33-8.
- 9 Menezes H. Própolis: uma revisão dos recentes estudos de suas propriedades farmacológicas. Arq Inst Biol. 2005;72(3): 405-11.
- 10 Bankova V. Recent trends and important developments in propolis research. Evid Based Complement Alternat Med. 2005 Mar;2(1): 29-32.
- 11 Stepanovic S, Antie N, Dakie I, Svabie-Vlahovic M. *In vitro* antimicrobial activity of propolis and synergism between propolis and antimicrobial drugs. Microbiol Res. 2003;158: 353-7.

- 12 Sousa JPB, Furtado NAJC, Jorge R, Soares AEE, Bastos JK. Perfis físico-químico e cromatográfico de amostras de própolis produzidas nas microrregiões de Franca (SP) e Passos (MG), Brasil. *Rev bras farmacogn.* 2007 Jan-Mar;17(1).
- 13 Fernandes Junior A, Balestrin EC, Betoni JEC, Orsi RO, Cunha MLRS, Montelli AC. Propolis: anti-*Staphylococcus aureus* activity and synergism with antimicrobial drugs. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005;100(5): 563-6.
- 14 Silva RA, Rodrigues AE, Ribeiro MCM, Custódio AR, Andrade NED, Pereira WE. Características físico-químicas e atividade antimicrobiana de extratos de própolis da Paraíba, Brasil. *Cienc Rural.* 2006 Nov-Dez;36(6).
- 15 Yong KP, Alencar SM, Scamparini ARP, Agular CL. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. *Cienc Rural.* [periódico online] 2002 Dez; [citado 08 janeiro 2009];32(6). Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84820020006000013](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84820020006000013)
- 16 Pereira AS, Seixas FRMS, Aquino Neto FR. PRÓPOLIS: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. *Quim Nova.* 2002 Abr-Mai;25(2).
- 17 Lofty M. Biological activity of bee propolis in health and disease. *Asian Pacific J Cancer Prevent.* 2006;7:22-30.
- 18 Lima EQ, Ferreira AL, Gomes AAB, Queiroga Neto V, Oliveira E, Freitas MF. Avaliação comparativa da atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera*, *Melipona subnitida* e *Tetragonisca angustula*. *Newslab.* 2009 Abr-Mai;93: 178-86.
- 19 Vargas AC, Loguercio AP, Witt NM, Costa MM, Silva MS, Viana LR. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato etanólico de própolis. *Cienc Rural.* 2004 Jan-Fev;34(1).
- 20 Pepeljnjak S, Kokalec, I. Galangin expresses bactericidal activity against multiple-resistant bacteria: MRSA, *Enterococcus* spp. and *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiol Lett.* 2004;240: 111-6.
- 21 Teixeira EW, Message D, Negri G, Salatino A, Stringheta PC. Seasonal variation, chemical composition and antioxidant activity of Brazilian propolis samples. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2008 Jan: 1-9.
- 22 Bankova V. Chemical diversity of propolis and the problem of standardization. *J Ethnopharmacol.* 2005;100: 114-7.

- 23 Gonsales GZ, Orsi RO, Fernandes Junior A, Rodrigues P, Funari SRC. Antibacterial activity of propolis collected in different regions of Brazil. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis*. 2006;12(2): 276-84.
- 24 Fernandes Junior A, Lopes MMR, Colombardi V, Monteiro ACM, Vieira EP. Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. *Cienc Rural*. 2006 Jan-Fev;36(1).
- 25 Uzel A, Sorkun K, Onçag O, Çogulu D, Gençay O, Salih B. Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples. *Microbiol Res*. 2005;160: 189-95.
- 26 Kujungiev A, Tsvetkova I, Serkedjieva Y, Bankova V, Christov R, Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol*. 1999;64: 235-40.
- 27 Krzek J, Kaleta J, Hubicka U, Niedzwiedz A. Reversed phase high-performance liquid chromatography determination of select phenolic acids in propolis concentrates in terms of standardization for drug manufacturing purposes. *J AOAC Int*. 2006;89(2): 352-8.
- 28 Bera A, Almeida-Muradian LB. Mel com própolis: considerações sobre a composição e rotulagem. *Rev Inst Adolfo Lutz*. 2005;64(1): 117-21.
- 29 Marcucci MC. Própolis tipificada: um novo caminho para a elaboração de medicamentos de origem natural, contendo este produto apícola. *Rev Fitos*. 2008 Mar;1(3): 36-45.
- 30 Bankova VS, de Castro SL, Marcucci MC. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. *Apidologie (Celle)*. 2000;31: 3-15.
- 31 Salomão K, Pereira PRS, Campos LC, Borba CM, Cabello PH, Marcucci MC, et al. Brazilian propolis: Correlation between chemical composition and antimicrobial activity. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2008 Set;5(3): 317-24.
- 32 Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa N<sup>o</sup>3, de 19 de Janeiro de 2001. Regulamento de identidade e qualidade de extrato de própolis. [online] Brasília (DF), 2001. Disponível em: <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis-consulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1798> (27 Jul 2009)

- 33 Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol.* 1998;36:347-63.
- 34 Castaldo S, Capasso F. Propolis, and old remedy used in modern medicine. *Fitoterapia.* 2002;73 (Suppl 1): 81-6.
- 35 Kabala-Dzik A, Szaflarska-Stojko E, Wojtyczka RD, Stojko A, Stojko R, Pacha J, et al. Efficiency assessment of antimicrobial activity of honey-balm on experimental burn wounds. *Bull Vet Inst Pulawy.* 2004;48: 109-12.
- 36 Kabala-Dzik A, Stojko R, Szaflarska-Stojko E, Wroblewska-Adamek I, Stojko A, Stojko J, et al. The influence of propolis balm on the healing process of experimentally induced burn wounds. *Ann Acad Med Siles.* 2004;58(2): 111-5.
- 37 Scazzochio F, D'Auria FD, Alessandrini D, Pantanella F. Multifactorial aspects of antimicrobial activity of propolis. *Microbiol Res.* 2006;161: 327-33.
- 38 Mantovani RP, Rall VLM, Batalha JEN, Fernandes AAH, Fernandes Junior A. Anti-coagulase-negative *Staphylococcus* activity of ethanolic extracts of propolis from two Brazilian regions and synergism with antimicrobial drugs by the E-test method. *J Venom Anim Toxins incl Trop Dis.* 2008;14(2): 357-65.
- 39 Korn GP, Martino MDV, Mimica IM, Mimica LMJ, Chiavone PA, Musolino LRS. High frequency of colonization and absence of identifiable risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in intensive care units in Brazil. *Braz J Infect Dis.* [periódico online] 2001 Fev; [citado 25 maio 2009]; 5(1). Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-86702001000100001](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702001000100001)
- 40 Lowy FD. Antimicrobial resistance: the example of *Staphylococcus aureus*. *J Clin Invest.* 2003;111(9): 1265-73.
- 41 Chambers HF. The changing epidemiology of *Staphylococcus aureus*? *Emerg Infect Dis.* 2001 Mar-Abr;7(2): 178-82.
- 42 Safdar N, Maki DG. The commonality of risk factors for nosocomial colonization and infection with antimicrobial-resistant *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus*, Gram-negative Bacilli, *Clostridium difficile* and *Candida*. *Ann Intern Med.* 2002;136(11): 834-44.

- 43 Mimica MJ, Berezin EN, Carvalho RLB, Mimica IM, Mimica LMJ, Sáfadi MAP, et al. Detection of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus* isolated from pediatric patients: is the cefoxitin disk diffusion test accurate enough? Braz J Infect Dis. [periódico online] 2007 Ago; [citado 25 maio 2009]; 11(4). Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-86702007000400009](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-86702007000400009)
- 44 Von Eiff C, Becker K, Machka K, Stammer H, Peters G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. N Engl J Med. 2001;344(1): 11-6.
- 45 Perl TM, Cullen JJ, Wenzel RP, Zimmerman MB, Pfaller MA, Sheppard D, et al. Intranasal mupirocin to prevent postoperative *Staphylococcus aureus* infections. N Engl J Med. 2002;346(24): 1871-7.
- 46 Perl TM. Prevention of *Staphylococcus aureus* infections among surgical patients: beyond traditional perioperative prophylaxis. Surgery. 2003;134(5): 10-6.
- 47 Wertheim HFL, Margreet CV, Alewijn O, Voss A, Kluytmans JAJW, Vandernbroucke-Grauls CMJE, et al. Mupirocin prophylaxis against nosocomial *Staphylococcus aureus* infections in nonsurgical patients. Ann Intern Med. 2004;140:419-25.
- 48 Miranda VR, Marc B, Richard W, Jan K. Mupirocin ointment for preventing *Staphylococcus aureus* infections in nasal carriers. (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 1, 2009. Oxford: Update Software.
- 49 Cushnic TPT, Lamb AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agents. 2005;26:343-56.
- 50 Amorim ML, Vasconcelos C, Oliveira DC, Azevedo A, Calado E, Faria NA, et al. Epidemiology of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) nasal colonization among patients and healthcare workers in a Portuguese hospital: A pre-intervention study toward the control of MRSA. Microb Drug Resist. 2009;15(1): 19-25.
- 51 Nieven DJ, Laupland KB, Gregson DB, Church DL. Epidemiology of *Staphylococcus aureus* nasal colonization and influence on outcome in the critically ill. J Crit Care. In press 2009.
- 52 Onlen Y, Duran N, Atik E, Savas I, Altug E, Yacan S, et al. Antibacterial activity of propolis against MRSA and synergism with topical mupirocin. J Altern Complement Med. 2007;13(7): 713-8.

- 53 Huang JT, Abrams M, Tiougan B, Rademaker A, Paller AS. Treatment of *Staphylococcus aureus* colonization in atopic dermatitis decreases disease severity. *Pediatrics*. 2009 Mai;123(5): 808-13.
- 54 Girón RM, Buendía B, Pinedo C, Casanova A, Hoyos N, Ancochea J. *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina en pacientes adultos con fibrosis quística. *Enferm Infect Microbiol Clin*. 2009;27(2): 85-8.
- 55 Marcucci MC. Processo de identificação de tipagens da própolis brasileira. Pedido de patente no INPI (Brasil). 2000; PI0006272-3 A2.
- 56 Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Nineteenth informational supplement. CLSI document M100-S19. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania, Estados Unidos, 2009.
- 57 Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard – Seventh Edition CLSI document M7-A7. Clinical and Laboratory Standards Institute. Wayne, Pennsylvania, Estados Unidos, 2006.
- 58 Steers E, Foltz EL, Graves BS. An inocula replicating apparatus for routine testing of bacterial susceptibility to antibiotics. *Antibiot Chemother*. 1959;9:307-11.
- 59 Fernandes Junior A, Sugizaki MF, Fogo ML, Funari SRC, Lopes CAM. *In vitro* activity bacterial and yeast pathogens isolated from human infections. *J. Venom. Anim. Toxins*. [periódico online] 1995; [citado 08 janeiro 2009]; 1(2). Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0104-79301995000200003](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-79301995000200003)
- 60 Silici S, Kutluca S. Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region. *J Ethnopharmacol*. 2005;99: 69-73.
- 61 Rezende GPSR, Pimenta FC, Costa LRRS. Antimicrobial activity of two brazilian commercial propolis extracts. *Braz J Oral Sci*. 2006 Jan-Mar;5(16): 967-70.

- 62 Miorin PL, Levy Junior NC, Custodio AR, Bretz WA, Marcucci MC. Antibacterial activity of honey and propolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*. J Appl Microbiol. 2003;95: 913-20.
- 63 Salomão K, Dantas AP, Borba CM, Campos LC, Machado DG, Aquino Neto FR, et al. Chemical composition and microbicidal activity of extracts from Brazilian and Bulgarian propolis. Lett Appl Microbiol. 2004;38: 87-92.
- 64 Li-Chang L, Yue-Wen C, Cheng-Chun C. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. Int J Food Microbiol. 2005;102: 213-20.
- 65 Brasil. Ministério da Saúde. Resolução RDC n° 132 de 29 de Maio de 2003. Dispõe sobre o registro de medicamentos específicos. [online] Brasília (DF), 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br> (20 Ago 2009)
- 66 Brasil. Ministério da Saúde. Nota técnica sobre o registro de produtos à base de própolis de 14 de setembro de 2005. [online] Brasília (DF), 2005. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/medicamentos/catef/propolis.htm> (22 Out 2009)

**FONTES CONSULTADAS**

---



## **FONTES CONSULTADAS**

1. Avanzi O. Normalização para apresentação de dissertações e teses. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo; 2004. 26p.



## RESUMO

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) é um dos patógenos mais freqüentes causadores de infecções endêmicas e epidêmicas adquiridas em hospitais, resultando em taxas de mortalidade e morbidade significativas. Infecções adquiridas na comunidade também são comuns. A prevenção e tratamento de infecções causadas por *S. aureus* tem se tornado tarefa difícil devido ao surgimento de cepas multirresistentes. Neste contexto, o uso de produtos naturais, como a própolis, tem sido uma estratégia para o descobrimento de novos medicamentos. Sendo que a falta de padronização da composição química da própolis é uma característica favorável para sua utilização como antimicrobianos, pois evita o desenvolvimento de mecanismos de resistências pelos micro-organismos. Com o objetivo de determinar a atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato etanólico de própolis frente a cepas de *S. aureus* e definir a CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> foram estudadas 210 cepas provenientes da bacterioteca do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo. Além disso, tipificar a própolis *in natura* e o respectivo extrato etanólico quanto à presença de marcadores químicos pré-definidos. Para a definição da CIM foi utilizado o método de diluição em ágar e para a tipificação metodologia desenvolvida e descrita por Marcucci (2000). Os resultados de CIM variaram de 710 a 2850 µg de extrato seco da própolis / mL do meio. As CIM<sub>50</sub> e CIM<sub>90</sub> para as 210 cepas utilizadas no trabalho como também para a análise individual das cepas ATCC de MSSA e MRSA são coincidentes e correspondem a 1420 µg/mL. A partir da análise cromatográfica da própolis *in natura* e o seu respectivo extrato etanólico concluiu-se que se trata de uma mistura de própolis tipos BRP(SP/MG) e BRP(PR), sendo que as amostras possuem todos os marcadores definidos para ambos os tipos. Para a administração clínica da própolis são necessários estudos *in vivo* para a confirmação dos resultados.



## ABSTRACT

*Staphylococcus aureus* (*S. aureus*) is among the most frequent pathogen causing endemic infections and epidemics acquired in hospitals, which results in significant death and morbidity rates. The infections acquired from the community are also common. The prevention and treatment of infections caused by *S. aureus* has become difficult due to the appearance of the multi-resistant strains. In such context, the use of natural products such as propolis has become the strategy to find out new drugs. In view of lacking in standardization for the propolis chemical composition, this becomes a favorable characteristic on the use as antimicrobial as this avoids the development of resistance mechanisms by microorganisms. In order to establish the antimicrobial activity in vitro of the ethanolic extract of propolis in respect to *S. aureus* strain and to define Minimal Inhibitory Concentration<sub>50</sub> (MIC<sub>50</sub>) and MIC<sub>90</sub>, 210 strains from Microbiology Laboratory of the Pathology Department of Medical Sciences School of Santa Casa de São Paulo [Charity Hospital of São Paulo] were studied; as well as to typify the in natura propolis and the respective ethanolic extract in respect to the presence of the previously defined chemical markers. Regarding MIC definition, the agar dilution method was used, in respect to the typifying, a methodology developed and described by Marcucci (2000) was used. MIC results varied from 710 up to 2850 µg of dry propolis extract / mL of the mean. MIC<sub>50</sub> and MIC<sub>90</sub> for 210 strains used in the work as well as the individual analysis of ATCC strain of MSSA and MRSA coincide and correspond to 1420 µg/mL. In view of the chromatographic analysis of the propolis in natura and the respective ethanolic extract, a conclusion was made that this refers to the BRP(SP/MG) and BRP(PR) propolis mix types; also, the samples have all markers defined for both types. In vivo studies are required for the clinical administration of propolis in order to confirm the results.



## APÊNDICE



**IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**  
 Rua Santa Isabel, 305 - 4º andar Santa Cecília CEP: 01221-010 São Paulo – SP  
 PABX: 21767000 Ramal: 8061 – Telefax: 33370188 E-mail: [eticamed@santacasasp.org.br](mailto:eticamed@santacasasp.org.br)

São Paulo, 02 de julho de 2008.

**Projeto nº 153/08**  
 Informe este número para  
 identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a) Sr.(a)

**Dra. Lucila Coelho Pamplona Zomenhan**

Serviço de Controle de Infecção Hospitalar

O Comitê de Ética e Pesquisa da ISCMSP, em reunião ordinária, dia **28/05/2008** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **“Avaliação da ação antimicrobiana de extratos etanólicos e sprays de própolis frente a cepas hospitalares multi-resistentes”**, emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

- Aprovado (inclusive TCLE);**  
**Com pendências** há modificações ou informações relevantes a serem atendidas em 60 dias, (enviar as alterações em **duas cópias**);
- Retirado**, (por não ser reapresentado no prazo determinado);
- Não aprovado:** e
- Aprovado (inclusive TCLE - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido)**, e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – MS - CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. **Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.**

**Prof. Dr. Nelson Keiske Ono**

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa – ISCMSP



**IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE S.PAULO**  
**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**

Rua Santa Isabel, 305 4º Santa Cecília CEP 01221-010 São Paulo –SP  
PABX: (11) 21767000 Ramal: 8061- Telefax-33370188 E-mail: [eticamed@santacasasp.org.br](mailto:eticamed@santacasasp.org.br)

São Paulo, 13 de maio de 2009.

Ilmo.(a).Sr.(a)

Dr.(a). **Lucila Coelho Pamplona Zomenhan**

Serviço de Controle de Infecção Hospitalar

Estamos encaminhando parecer do Comitê de Ética em Pesquisa -SC referente Emenda datada de 26-03-09 ao Projeto nº 153/08 "**Avaliação da ação antimicrobiana de extratos etanólicos e sprays de própolis frente a cepas hospitalares multi-resistentes**".

---

**Prof. Dr. Nelson Keiske Ono**

Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa  
ISCMSP



**IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO**  
**Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos**

**Parecer consubstanciado**

Projeto no. 153/08

**I. Identificação:**

Título do projeto: "Avaliação da ação antimicrobiana *in vitro* de Extrato Etanólico de Própolis frente a cepas de *Staphylococcus aureus*". Emenda de 26 de março de 2009.

Pesquisador responsável: Lucila Coelho Pamplona Zomenhan

Instituição: Dept de Ciências Patológicas da FCMSCSP

Data de entrada no CEP: 27 de março de 2009

**II. Objetivos:**

Determinar a atividade microbiana *in vitro* de extrato etanólico de própolis frente a cepas de *Staphylococcus aureus*.

**III. Resumo do Projeto**

Cepas de *Staphylococcus aureus* serão cultivadas em ágar, com utilização do Repicador de Steers, para a determinação das concentrações inibitórias mínimas.

**IV. Comentários:**

Trata-se de estudo prospectivo *in vitro*, sem a participação de seres humanos. Os princípios da Resolução 196/96 MS e a aplicação de TCLE não se aplicam neste estudo.

**V. Parecer:**

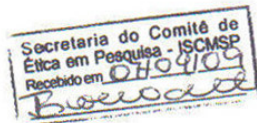
Aprovado.

  
Niro Kasahara  
Relator CEP-ISCMSp

São Paulo, 05 de abril de 2009.

Parecer aprovado na  
reunião do CEP  
dia 13/05/09

  
Prof. Dr. Nelson Keiske Ono  
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa  
ISCMSp



# Livros Grátis

( <http://www.livrosgratis.com.br> )

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)  
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)  
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)  
[Baixar livros de Matemática](#)  
[Baixar livros de Medicina](#)  
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)  
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)  
[Baixar livros de Meteorologia](#)  
[Baixar Monografias e TCC](#)  
[Baixar livros Multidisciplinar](#)  
[Baixar livros de Música](#)  
[Baixar livros de Psicologia](#)  
[Baixar livros de Química](#)  
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)  
[Baixar livros de Serviço Social](#)  
[Baixar livros de Sociologia](#)  
[Baixar livros de Teologia](#)  
[Baixar livros de Trabalho](#)  
[Baixar livros de Turismo](#)