

EFEITO ANTIMICROBIANO DA PRÓPOLIS VERDE FRENTE A CEPAS DE *Staphylococcus aureus* RESISTENTES À METICILINA (MRSA)

CLEITON GONÇALVES AGUIAR¹, LUCIENE GONÇALVES LIMA², LETÍCIA ANTUNES ATHAYDE³

¹ Graduado em Biomedicina pela Faculdade de Saúde Ibituruna – Fasi.

² Graduada em Biomedicina pela Faculdade de Saúde Ibituruna – Fasi.

³ Biomédica. Mestre em Biociências pela Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo. Doutoranda em Ciências da Saúde pela Universidade Estadual de Montes Claros. Docente da Faculdade de Saúde Ibituruna.

RESUMO:

A própolis possui uma propriedade antimicrobiana comprovada contra bactérias Gram-positivas, especialmente contra *Staphylococcus* spp. Entretanto, não há resultados conclusivos a respeito da ação da própolis contra *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina. Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar o efeito antimicrobiano da própolis verde, proveniente da região sudeste do Brasil, sobre cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilina comparando com cepa não multirresistente, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) e identificando uma possível ação bactericida ou bacteriostática desse produto frente a essas mesmas cepas bacterianas. Testes de microdiluições em microplacas, macrodiluições em tubos e difusão em disco foram realizados com diluições da própolis tanto em caldo BHI quanto em etanol, nas concentrações de 11; 5,5; 2,75; 1,35; 0,68; 0,34; 0,17 e 0,08%. O etanol a 100% não foi considerado um bom diluente para avaliar efeito antimicrobiano de extratos, por apresentar inibição interferente. Apesar da difusão em disco não ter apresentado ação antibacteriana do extrato de própolis verde, as macro e microdiluições demonstraram que a própolis inibe de maneira significativa as cepas clínicas de MRSA e *S. aureus* nas concentrações de 11 a 0,17%. Sua ação pode ser tanto bactericida quanto bacteriostática. Ficou evidente que o mecanismo de resistência do MRSA não o impede de ser sensível aos compostos antimicrobianos da própolis verde, não havendo relação entre sensibilidade a oxacilina e sensibilidade a própolis.

Palavras-chave: própolis; *staphylococcus aureus*; sensibilidade microbiana.

ABSTRACT:

Propolis has a proven antimicrobial property against Gram-positive bacteria, especially against *Staphylococcus* spp. However, one does not have conclusive results about the propolis against *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin. Thus, the aim of this study was to evaluate the antimicrobial effect of green propolis, obtained from southeastern Brazil, on clinical strains of *Staphylococcus aureus* resistant to methicillin compared with non multiresistant strain, determining the minimum inhibitory concentration (MIC) and identifying possible bactericidal or bacteriostatic action of this product compared to these same bacterial strains. Dilution tests in microplates and tubes and disk diffusion were conducted with both dilutions of propolis in BHI broth as ethanol, in concentrations of 11; 5.5; 2.75; 1.35; 0.68; 0.34; 0.17 and 0.08%. The ethanol 100% was not considered a good diluent to evaluate antimicrobial effect of extracts for inhibiting interference present. Despite the disk diffusion did not provide antibacterial action of propolis extract, dilution tests in microplates and tubes showed that propolis inhibits significantly the clinical strains of MRSA and *S. aureus* at concentrations from 11 to 0.17%. Its action can be both bactericidal as bacteriostatic. It was evident that the MRSA resistance mechanism does not prevent it from being sensitive to antimicrobial compounds of green propolis, there is no link between sensitivity to oxacillin and sensitivity to propolis.

Keywords: propolis; *Staphylococcus aureus*; microbial sensitivity.

Autor responsável pela correspondência: Letícia Antunes Athayde – Email: leticia.athayde@gmail.com

INTRODUÇÃO

Staphylococcus aureus (*S. aureus*) é uma bactéria encontrada colonizando a microbiota natural, principalmente da pele, podendo tornar-se patogênica em condições como a quebra da barreira cutânea ou diminuição da imunidade. É responsável por uma grande variedade de infecções, como infecções na pele e no subcutâneo, infecções pós-cirúrgicas, osteomielites, pneumonias, abscessos, endocardites e bacteremia; sendo também uma das causas mais comuns de infecções nosocomiais, bem como de infecções comunitárias que podem apresentar altos índices de morbidade e mortalidade.¹

Garza-González² afirma que uma questão importante em relação a micro-organismos do gênero *Staphylococcus* sp. é a habilidade de desenvolver mecanismos de resistência a antimicrobianos, o que tem trazido grande preocupação para a comunidade médica e científica. Cepas com resistência múltipla a agentes antimicrobianos têm sido responsáveis principalmente por infecções em unidades de saúde. Desde a introdução de antimicrobianos na prática da medicina

moderna, membros do gênero *Staphylococcus* evoluíram em resposta a essa pressão.³

A terapia antimicrobiana para infecções por esse micro-organismo inicialmente era a penicilina. Depois começaram aparecer isolados resistentes a esse antimicrobiano. Para contornar o problema, foi criado o beta-lactâmico sintético metilina, que era resistente à ação das beta-lactamases que o *S. aureus* produzia. Entretanto, logo após o advento da metilina, surgiram relatos de amostras resistentes também a esse antimicrobiano, além da expressão de multirresistência. Essas cepas foram denominadas de MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à metilina) e são resistentes a todos os antimicrobianos beta-lactâmicos.¹

Segundo estudos de Ratti e Souza⁴, essas cepas se tornaram um problema clínico e epidemiológico mundial sendo implicadas como significativamente patogênicas em infecções hospitalares.

O aumento do número de infecções causadas por *S. aureus* resistentes à metilina (MRSA), nas quais é muito frequente a ocorrência de resistência múltipla, constitui um

sério problema para o início de uma terapia.⁶ A magnitude da ameaça à saúde devido à disseminação de bactérias resistentes aos antibióticos em geral e, em particular, de MRSA tem sido largamente reconhecida pelas agências de saúde pública e pelos governos.⁷

Pensando-se na própolis como agente antibacteriano, vários trabalhos científicos vêm demonstrando sua ação contra bactérias Gram-positivas, dando a esse produto um longo histórico de combate a doenças de diversos tipos, em especial as causadas por *Staphylococcus* spp.⁸ Entretanto, não se tem resultados conclusivos a respeito da ação da própolis contra *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina.

A própolis é um material resinoso de consistência viscosa elaborado pelas abelhas que coletam a matéria-prima de diversas partes das plantas como brotos, cascas e exsudatos de árvores, transformando-as dentro da colmeia pela adição de secreções salivares e cera.⁹

A própolis tem sido objeto de estudos farmacológicos devido às suas propriedades antibacteriana, antifúngica, antiviral, anti-inflamatória, hepatoprotetora, antioxidante, antitumoral e imunomodulatória.^{9,10} Entre as propriedades biológicas da própolis, a antimicrobiana tem sido a mais estudada.¹¹

Os principais grupos químicos encontrados na própolis são flavonoides, como a galangina, quercetina, pinocembrina e kaempferol, além de terpenoides e fenilpropanoides como os ácidos cafeico e clorogênico.¹² No que diz respeito aos componentes ativos mais importantes da própolis, é possível citar os ácidos aromáticos, compostos fenólicos, em especial flavonoides (flavonas, flavonóis e flavononas) e ácidos fenólicos.¹³

Segundo Bontempo¹⁴, a própolis verde brasileira é considerada a melhor e mais eficiente do mundo pelo fato do Brasil apresentar clima e meio ambiente favoráveis para as abelhas produzirem própolis com essa qualidade superior.

Diante dessas disposições e buscando complementá-las, o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito antimicrobiano da própolis verde sobre cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina comparando com cepa não multirresistente, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) e identificando uma possível ação bactericida ou bacteriostática desse produto frente a essas mesmas cepas bacterianas.

MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de um estudo quantitativo, descritivo e de caráter experimental, no qual foram utilizadas linhagens de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina (MRSA) e *S. aureus* provenientes de isolados de amostras biológicas de pacientes de uma coleção de um laboratório de um hospital de Montes Claros – MG. A escolha das cepas a serem testadas corrobora com o relatado por Cos et al.¹⁵, quando afirma a importância de avaliar cepas de referência multirresistentes nos testes de atividade antimicrobiana de produtos naturais.

Para avaliar o efeito antimicrobiano, foi utilizado o extrato de própolis verde 11% (marca: Apis Flora[®]) que foi obtido a partir da coleta e transformação pelas abelhas em suas colmeias, após visitar uma planta nativa do Brasil, a *Baccharis dracunculifolia* (Vassourinha ou Alecrim do Campo). O extrato é composto dos seguintes ingredientes: própolis verde, álcool neutro (etanol) grau alimentício 95,1% e água

purificada.

Para a determinação da atividade antibacteriana da própolis foram realizados testes de microdiluições em microplaca de 96 cavidades, macrodiluições em tubos e difusão em disco, segundo o protocolo estabelecido pelo CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*)¹⁶, com finalidade de identificar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM).

Suspensão das linhagens de *S. aureus* e MRSA

Foram utilizados 1 linhagem de *S. aureus* e 3 linhagens de MRSA provenientes de isolados clínicos de pacientes diferentes.

A partir da coleção, foi realizado inóculo no caldo BHI (Brain Heart Infusion) de 4 a 5 colônias de cada linhagem para evitar selecionar uma cepa variante atípica. Após o crescimento, foi realizada uma suspensão das linhagens em água destilada estéril até que atingisse a escala 0,5 de McFarland (1×10^8 UFC/mL), a qual foi medida em espectrofotômetro com uma densidade óptica de 625 nm e absorvância entre 0,08 e 0,1.

Diluição do extrato de própolis

A própolis foi diluída de duas formas: em etanol e em caldo BHI, com o objetivo de avaliar se a ação antibacteriana do etanol influenciaria no efeito antimicrobiano da própolis. Foram realizadas diluições seriadas de razão 2 a partir do extrato puro obtendo as seguintes concentrações finais: 5,5; 2,75; 1,35; 0,68; 0,34; 0,17 e 0,08%.

Concentração inibitória mínima (CIM)

Microdiluição

Alíquotas de 20 µL de cada linhagem foram inoculadas em microplacas contendo 80 µL de caldo BHI. Em seguida, foram adicionados 100 µL da própolis diluídas em etanol ou em caldo BHI em cada cavidade nas respectivas concentrações: 11; 5,5; 2,75; 1,35; 0,68; 0,34; 0,17 e 0,08%. Como controle de esterilidade, foi adicionado 200 µL de caldo BHI; como controle de crescimento, foram adicionados 20 µL de cada linhagem e 180 µL de caldo BHI. Para verificar o efeito antimicrobiano associado ao etanol, e não à própolis, 20 µL de cada linhagem foram inoculados em 80 µL de caldo BHI e 100 µL de etanol. O ensaio foi realizado em duplicata. Em seguida, as microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após a incubação, foram adicionados 30 µL de resazurina (0,01%) e incubado novamente por 2 horas. Em seguida, foi realizada a leitura.

A resazurina é um indicador de óxido redução, utilizado para revelar alteração de pH no meio determinado pelo crescimento bacteriano.^{17, 18} As cavidades que adquirirem uma coloração rosada indicam a reação química de óxido-redução da resazurina em resorufina, sendo interpretada como presença de células viáveis, enquanto que nas cavidades onde não há mudança na coloração do corante, interpreta-se como ausência de células viáveis, indicando inibição do crescimento celular pelo extrato.¹⁸

A concentração inibitória mínima foi considerada como a menor concentração de extrato de própolis verde onde não foi visualizado crescimento microbiano.

Macrodiluição

Da mesma forma como foram realizadas as

microdiluições na microplaca, também foram realizadas macrodiluições em tubos com o volume proporcional à microdiluição. O volume foi triplicado e os procedimentos de leitura e interpretação foram os mesmos.

Disco difusão

A atividade antimicrobiana da amostra de própolis também foi avaliada pelo método de difusão em disco. Esse teste consistiu na aplicação de 10 µL da solução de agente antimicrobiano em discos de papel de filtro estéril de 6 mm de diâmetro, nas diferentes concentrações já citadas. Como controle positivo, foram utilizados discos de cefoxitina, e como controle negativo, discos com apenas o solvente de cada diluição. As placas de Agar Muller Hinton foram incubadas a 37°C por 24 horas, e, em seguida, o halo de inibição (em mm) foi medido com um paquímetro.^{19, 20}

Concentração bactericida mínima (CBM)

Após a incubação tanto na microdiluição como na macrodiluição e antes do acréscimo da resazurina, foi retirada uma alíquota de 10 µL de todas as cavidades e inoculada em

ágar Muller-Hinton, ágar sangue e caldo tioglicolato, incubando-se a 37°C por 24 horas. A CBM foi considerada como a menor concentração de extrato na qual não houve crescimento dos micro-organismos nas placas, ou seja, houve eliminação dos microrganismos.^{16, 17} Também foram realizadas coloração de Gram das diluições da própolis para observar algum efeito na morfologia bacteriana, ou mesmo um efeito bacteriolítico da própolis. O ensaio foi realizado em duplicata.

RESULTADOS

Foi realizada uma comparação do efeito antimicrobiano da própolis diluída em etanol e da própolis diluída em caldo BHI frente às seguintes cepas: 01 cepa de *Staphylococcus aureus* e 03 cepas de MRSA provenientes de amostras biológicas de pacientes de um hospital, na qual foram utilizadas as técnicas de microdiluição e macrodiluição.

Avaliando a CIM das cepas estudadas, observou-se que, tanto na micro quanto na macrodiluição não houve crescimento bacteriano de nenhuma das cepas nas diluições da própolis com etanol. Entretanto, quando a própolis foi diluída no próprio caldo BHI, observou-se que a CIM das 04 cepas foi na concentração de 0,17% (Tabela 1).

Tabela 1. Concentração inibitória mínima (CIM) da própolis diluída em etanol e diluída em caldo BHI nas técnicas de micro e macrodiluição.

Cepas	Própolis diluída em etanol	Própolis diluída em caldo BHI
MRSA 1	Não houve CIM	0,17%
MRSA 2	Não houve CIM	0,17%
MRSA 3	Não houve CIM	0,17%
<i>S. aureus</i>	Não houve CIM	0,17%

Analisando a CBM das cepas estudadas, observou-se que não houve crescimento bacteriano na própolis diluída em etanol para nenhuma das concentrações no ágar Muller-Hinton, ágar sangue e caldo tioglicolato. Porém, na própolis

diluída em caldo BHI, observou-se que a CBM das 04 cepas no ágar MH e ágar sangue foi de 0,34%, enquanto no caldo tioglicolato foi de 0,68% (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração bactericida mínima (CBM) da própolis diluída em etanol e diluída em caldo BHI nas técnicas de micro e macrodiluição.

Cepas	Própolis diluída em etanol			Própolis diluída em caldo BHI		
	MH	ASA	TIO	MH	ASA	TIO
MRSA 1	Não houve CBM			0,34%	0,34%	0,68%
MRSA 2	Não houve CBM			0,34%	0,34%	0,68%
MRSA 3	Não houve CBM			0,34%	0,34%	0,68%
<i>S. aureus</i>	Não houve CBM			0,34%	0,34%	0,68%

MH: ágar Mueller Hinton, ASA: ágar sangue, TIO: caldo tioglicolato

Através da comparação do efeito antimicrobiano da própolis diluída em etanol com a própolis diluída em caldo BHI, observa-se que o etanol interfere na leitura da própolis.

Analisando as colorações de Gram, a partir de amostras do tioglicolato, das diluições da própolis em caldo BHI até a concentração de 0,34%, não foi observada nenhuma morfologia bacteriana, já nas demais concentrações havia presença de cocos Gram positivos.

Quanto aos resultados da difusão em disco, nenhuma das cepas foi sensível ao extrato testado nas diversas

concentrações.

DISCUSSÃO

Nos testes de micro e macrodiluição do extrato de própolis com etanol foi verificada completa inibição das cepas, entretanto na realização da leitura do controle das suspensões bacterianas apenas com etanol e meio de cultura, para avaliar uma possível inibição desse diluente, tal fato foi confirmado. Sendo assim, não foi possível encontrar a CIM e nem CBM do extrato pela interferência da ação antibacteriana do etanol.

Esse resultado trouxe certa surpresa, pois a literatura contém vários trabalhos científicos que utilizaram o etanol para diluição da própolis, ainda que não utilizassem o etanol absoluto, mas também não se comprometeram a apresentar resultados para controle da ação antimicrobiana sinérgica desse solvente com o extrato que testaram.

Já nos testes de micro e macrodiluição do extrato da própolis diluída no caldo BHI, houve inibição das cepas até a concentração de 0,17%, determinando-se assim a CIM. Os resultados do plaqueamento em ágar e repiques em caldo das diluições também permitiram encontrar a CBM do extrato. Esse critério permitiu confirmar que o extrato de própolis a 11% possui uma atividade bactericida sobre as cepas clínicas de *Staphylococcus aureus* e MRSA.

Os resultados encontrados da CIM e da CBM, tanto para as cepas MRSA quanto para o *Staphylococcus aureus*, permitem concluir que essa espécie bacteriana apresenta um perfil de sensibilidade semelhante nas concentrações de própolis estudadas, mesmo na presença do mecanismo de multirresistência. Isso significa que o mecanismo de resistência das cepas MRSA, através da proteína PBP2a (*Penicillin Binding Protein 2a*), não consegue escapar da ação dos agentes antimicrobianos da própolis ou que esses mesmos agentes agem por outro sítio de ação que não seja pela PBP2a.

Segundo Takaisi-Kikumi e Schilcher²¹, o extrato etanólico da própolis inibe o crescimento microbiano por impedir a divisão celular, levando a bacteriólise, já que produz defeitos na parede celular, desorganiza citoplasma, além de inibir a síntese proteica. Esse fato pôde ser comprovado, neste estudo, ao realizar a coloração de Gram de alíquotas das diluições do extrato onde houve efeito bactericida total.

Cushnie e Lamb²² declaram que as propriedades antimicrobianas da própolis foram atribuídas principalmente aos seus flavonoides galangina e pinocembrin. Estas substâncias têm propriedades de inibição de várias enzimas. Sua ação pode ser competitiva ou mesmo alostérica. No caso da ação antibacteriana pode estar ocorrendo uma inibição do DNA polimerase, como comumente ocorre no mecanismo de ação de grande parte dos antimicrobianos. Para Ávila²³ e Li²⁴, o efeito antibacteriano dos flavonoides deve-se ainda à atribuição de grupos fenólicos hidróxilo que apresentam afinidade pelas proteínas e, por esse motivo, atuam como inibidores de enzimas bacterianas, assim como interferem nas suas vias de síntese.

A sensibilidade do MRSA ao extrato de própolis pode ser melhor justificada ainda pela citação de Xu e Lee²⁵, que afirmam que grupamentos fenólicos polihidroxilados dos flavonoides podem elevar a afinidade por proteínas desses compostos e causar a inibição de MRSA.

Os resultados obtidos neste estudo corroboram com os obtidos por Langoni²⁶ e Peter²⁷, que em suas análises, utilizando extrato de própolis, obtiveram 100% de inibição para o *Staphylococcus aureus*. No presente estudo, foi encontrada essa mesma sensibilidade para o MRSA.

A metodologia da CLSI considera como CBM a última diluição onde não houve crescimento ao plaqueamento em ágar, entretanto, nesta análise, houve crescimento de todas as linhagens avaliadas em uma diluição anterior (0,68%) em caldo tioglicolato. Isso requer que, apesar da metodologia apontar como CBM a concentração de 0,34% da própolis, tendo como referência o crescimento em placas, tomando como base o crescimento em caldo, não se pode concluir o mesmo.

Para a instrução normativa 26/2009²⁸, o termo concentração bactericida mínima (CBM) obedece aos protocolos internacionais padronizados pelo CLSI, sendo a menor concentração de um agente antimicrobiano capaz de reduzir a contagem microbiana em 99,9%. Entretanto, capturar com uma alça calibrada de 10µL apenas 0,1% (2 células) de células viáveis de mais ou menos 2000 unidades formadoras de colônias, conforme padronizado pelo inóculo, presentes em todas as diluições testadas com 99,9% (1998 células) de bactérias inibidas seria um evento quase impossível, ainda mais quando se considera o fato do crescimento bacteriano ter ocorrido nas duplicatas de todas as linhagens. Essa análise sugere que, na concentração de 0,34%, a ação da própolis verde não era mais bactericida, mas, sim, bacteriostática, ou seja, havia nas diluições do extrato provavelmente mais de 0,1% de células que não haviam sido reduzidas por efeito bactericida. As colorações de Gram, positivas para a presença de morfologia bacteriana a partir das concentrações onde houve turvação do tioglicolato, reforçam essa ideia. Estas células bacterianas apenas sofreram uma agressão capaz de inibir sua multiplicação, e quando inoculadas em um meio enriquecedor, como o tioglicolato, recuperaram suas funções metabólicas.²⁹

Analisando os resultados da difusão em disco, observou-se que todas as cepas foram sensíveis. Segundo Nascimento et al.³⁰, esse teste pode ter vários interferentes, como volatilidade dos solventes empregados, dificuldade de difusão em ágar, insolubilidade do extrato e complexidade química. No caso do extrato da própolis, supõe-se que os principais interferentes sejam a dificuldade de difusão em ágar, a insolubilidade do extrato e a menor superfície de contato das células bacterianas com os compostos antimicrobianos do extrato, que difere das micro e macrodiluições. Como os controles positivos com cefoxitina apresentaram os halos esperados, pode-se concluir que a técnica de difusão em disco foi corretamente executada.

Possíveis diferenças de sensibilidade à própolis deste estudo com outros relatados na literatura podem ser justificadas, conforme afirma Park et al.³¹, pelas variações na composição observadas das própolis de diferentes regiões, tipo de diluente e concentrações de teste. Própolis de diferentes origens geográficas, em especial do Brasil e da Europa, apresentam diferentes compostos químicos responsáveis pela atividade antimicrobiana.³²

CONCLUSÃO

Nas condições deste estudo, conclui-se que, apesar da difusão em disco não ter demonstrado a ação antibacteriana do extrato de própolis verde, provavelmente pela dificuldade de difusão em ágar e insolubilidade dos compostos, as macro e microdiluições, ao contrário, demonstraram que a própolis inibe de maneira significativa as cepas clínicas de MRSA e *S. aureus* nas concentrações de 11% a 0,17%. Sua ação pode ser tanto bactericida quanto bacteriostática.

Pode-se certificar que o etanol não é um bom diluente para testar atividade antimicrobiana de extratos por apresentar também ação antimicrobiana e causar interferência nas leituras dos desempenhos dos extratos.

Fica evidente que o mecanismo de resistência do MRSA não o impede de ser sensível aos compostos antimicrobianos da própolis verde, não havendo relação entre

sensibilidade à oxacilina e sensibilidade à própolis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ADELMAN J. Própolis: variabilidade composicional, correlação com a flora e bioatividade antimicrobiana/antioxidante [Dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, Mestrado em Ciência Farmacêutica; 2005.
2. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Brasil). Termo de cooperação nº. 27, de março de 2006. Controle interno da qualidade para testes de sensibilidade a antimicrobianos. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/>.
3. ÁVILA PH, Smânia EFA, Monache FD, et al. Structure – activity relationship of antibacterial chalcones. Bio and Med Chem [Internet]. 2008; 16: 9790 – 94.
4. BARBOSA, MA. Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* da *Punica granatum* Linn. frente a *Enterococcus faecalis* isolados clinicamente [Monografia]. João Pessoa: Universidade Federal da Paraíba, Centro de Ciências da Saúde, Curso de Graduação em Odontologia; 2010.
5. BONTEMPO M. Mel. Uma vida doce e saudável. São Paulo: Alaúde Editorial; 2008. p. 149.
6. Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for antimicrobial disk susceptibility testing – twenty fourth informational supplement. CLSI document M100-S24.
7. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2014.
8. COS P, VLITINCK, AJ, VANDEN BD, et al. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger *in vitro* 'proof-of concept'. J Ethnopharmacol [Internet]. 2006 jul; 106(3): 290–302.
9. CUSHNIE TPT, LAMB AJ. Antimicrobial activity of flavonoids. Int J Antimicrob Agnts [Internet]. 2005 nov; 26(5): 343-56.
10. DE VECCHI E, DRAGO L. Attività antimicrobica della propoli: casa c'è di nuovo? Le Infe in Med [Internet]. 2007 mar; 15(1):7-15.
11. FARIA NA, OLIVEIRA DC, WESTH H, et al. Epidemiology of emerging methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Denmark: a nationwide study in a country with low prevalence of MRSA infection. J Clin Microbiol [Internet]. 2005; 43:1836-42.
12. GARCÍA LA, GUILLAMÓN E, VILLARES A et al. Flavonoids as anti – inflammatory agentes: implications in cancer and cardiovascular disease. Inflamm Res [Internet]. 2009; 58(9): 537–52.
13. GARZA-GONZALEZ E, Morfin-Otero R, Llaca-Díaz JM, et al. *Staphylococcal cassette chromosome mec (SCC mec)* in methicillin-resistant coagulase-negative staphylococci. A review and the experience in a tertiary-care setting. Epidemiol Infect [Internet]. 2010 mai; 138(5): 645-54.
14. GELATTI LC, BONAMIGO RR, BECKER AP et al. *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicina: disseminação emergente na comunidade. An Bras Dermatol [Internet]. 2009; 84(5):501-6.
15. Gordien AY, Gray AJ, Franzblau SG, et al. Antimycobacterial terpenoids from *Juniperus communis* L. (Cupressaceae). J Ethnopharmacol [Internet]. 2009 dez; 126(3): 500-5.
16. KARAMAN I, ŞAHİN F, GÜLLÜCE M, et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. J Ethnopharmacol [Internet]. 2003 abr; 85(2-3):231-35.
17. KORU O, TOKSOY F, ACKEL CH, et al. *In vitro* antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. Anae [Internet]. 2007; 13(3-4): 140-45.
18. LANGONI H, DOMINGUES PF, FUNARI SRC, et al. Efeito antimicrobiano *in vitro* da própolis. Arq Bras Vet Zoot. [Internet] 1996 abr; 48(2): 227-29.
19. Li Y, LUO Y, HU Y, et al. Design, synthesis and antimicrobial activities of nitroimidazole derivatives containing 1,3,4 – oxadiazole scaffold as FabH inhibitors. Bio and Med Chem. [Internet] 2012 jul; 20(14): 4316 –22.
20. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil). Instrução Normativa nº. 26, de 10 de julho de 2009. Regulamento técnico para a fabricação, o controle de qualidade, a comercialização e o emprego de produtos antimicrobianos de uso veterinário. Diário Oficial da União 10 de jul 2009; Seção 1.
21. Morris DO, Rook KA, Shofer FS, Rankin SC. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003-04). Vet Dermatol [Internet]. 2006 out; 17(5): 332-7.
22. NASCIMENTO PFC, RODRIGUES CS, ANTONIOLLI AR, et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. Rev Bras Farm [Internet]. 2007 jan; 17(1):108-13.
23. OSTROSKY EA, MIZUMOTO MK, LIMA MEL, et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. Rev Bras Farmacogn [Internet]. 2008; 18(2): 301-07.
24. PARK YK, ALENKAR SM, SCAMPARINI ARP, et al. Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: Evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. Ciênc Rur [Internet]. 2002 dez; 32(6): 997-03.
25. PENNA BA. Distribuição de espécies e prevalência de resistência a metilicina em amostras de *Staphylococcus* sp. isoladas de cães [Tese]. Niterói: Universidade Federal Fluminense, Programa de Pós-graduação em Medicina Veterinária; 2013.
26. PETER CM, Picoli T, LATOSINSKI G, et al. Atividade *in vitro* da Própolis Verde e Própolis Marrom frente a cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus* isoladas de leite bovino. [Apresentação do XV Encontro de Pós-graduação da Universidade Federal de Pelotas; 2011 nov 18-22; Rio Grande do Sul, Brasil].
27. RABANAL RM, ARIAS A, PRADO B, et al. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. J Ethnopharmacol [Internet]. 2002; 81(2): 287-92.
28. RATTI RP, SOUSA CP. *Staphylococcus aureus* metilicina resistente (MRSA) e infecções nosocomiais. Rev Ciênc Farm Básica Apl [Internet]. 2009; 30(2): 137-143.
29. SANTOS CR, ARCEÑO S, CARVALHO ES, et al. Otimização do processo de extração de própolis através da verificação da atividade antimicrobiana. Rev Bras Farmacogn [Internet]. 2003; 13:71-4.
30. SILVA WJ, RACHED RN, ROSALEN PL, et al. Effects of nystatin, fluconazole and propolis on poly (methyl methacrylate) resin surface. Bras Dent J [Internet]. 2008; 19(3):190-96.
31. STRUELENS MJ, HAWKEY PM, French GL, et al. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. Clin Microbiol Infect [Internet]. 2009 fev; 15(2): 112-9.
32. TAKAISIKIKUNI NB, SCHILCHER H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined própolis provenance. Planta Med [Internet]. 1994 jun; 60(3): 222-27.
33. Xu HX, Lee SF. Activity of Plant Flavonoids Against Antibiotic – Resistant Bacteria. Phyto Res. [Internet] 2001 fev; 15(1): 39-43.