



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS  
CURSO DE MESTRADO



**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*  
DA PRÓPOLIS E ÓLEO OZONIZADO EM *Staphylococcus*  
*pseudintermedius* MULTIDROGA RESISTENTE ISOLADO  
DE OTITE E PIODERMITE SUPERFICIAL DE CÃES**

**ANA LUIZA ZILIO**

**Campo Grande – MS  
2022**

**ANA LUIZA ZILIO**

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO*  
DA PRÓPOLIS E ÓLEO OZONIZADO EM *Staphylococcus*  
*pseudintermedius* MULTIDROGA RESISTENTE ISOLADO  
DE OTITE E PIODERMITE SUPERFICIAL DE CÃES**

**EVALUATION IN VITRO OF ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PROPOLIS AND  
OZONIZED OIL IN *Staphylococcus pseudintermedius* MULTI DRUG  
RESISTANT ISOLATED FROM CANINE EXTERNAL OTITIS AND  
SUPERFICIAL PIODERMATITIS**

**ANA LUÍZA ZILIO**

**Orientador: Dra. Cassia Rejane Brito Leal**

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da  
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul,  
para a obtenção do título de Mestre em  
Ciências Veterinárias

**Campo Grande – MS  
2022**



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



**ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**  
**MESTRADO**

Aos doze dias do mês de julho do ano de dois mil e vinte e dois, às catorze horas, via *on line*, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos membros: Cassia Rejane Brito Leal (UFMS), Andrei Kelliton Fabretti (UFMS) e Antonio Francisco de Souza Filho (UFMS), sob a presidência do primeiro, para julgar o trabalho da aluna: **ANA LUÍZA ZÍLIO**, CPF 69807256100, do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Curso de Mestrado, da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, apresentado sob o título "**AValiação DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DA PRÓPOLIS E ÓLEO OZONIZADO EM Staphylococcus pseudintermedius MULTIDROGA RESISTENTE ISOLADO DE OTITE E Piodermite SUPERFICIAL DE CÃES**" e orientação de Cassia Rejane Brito Leal. A presidente da Banca Examinadora declarou abertos os trabalhos e agradeceu a presença de todos os Membros. A seguir, concedeu a palavra à aluna que expôs sua Dissertação. Terminada a exposição, os senhores membros da Banca Examinadora iniciaram as arguições. Terminadas as arguições, a presidente da Banca Examinadora fez suas considerações. A seguir, a Banca Examinadora reuniu-se para avaliação, e após, emitiu parecer expresso conforme segue:

| <b>EXAMINADOR</b>                                    | <b>AValiação</b> |
|------------------------------------------------------|------------------|
| Dra. Cassia Rejane Brito Leal (Presidente) _____     | (APROVADO)       |
| Dr. Andrei Kelliton Fabretti (Externo) _____         | (APROVADO)       |
| Dr. Antonio Francisco de Souza Filho (Externo) _____ | (APROVADO)       |

**RESULTADO FINAL:**  
( X ) Aprovação ( ) Aprovação com revisão ( ) Reprovação

OBSERVAÇÕES:

---



---

Nada mais havendo a ser tratado, a Presidente declarou a sessão encerrada e agradeceu a todos pela presença.

Assinatura

Campo Grande, 12 de julho de 2022.



Documento assinado eletronicamente por **Antonio Francisco de Souza Filho**, Usuário Externo, em 13/07/2022, às 10:44, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Cassia Rejane Brito Leal**, Professora do Magistério Superior, em 13/07/2022, às 10:45, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Andrei Kelliton Fabretti**, Professor do Magisterio Superior, em 14/07/2022, às 08:11, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Luiza Zilio**, Enfermeiro-area, em 18/07/2022, às 12:41, conforme horário oficial de Mato Grosso do Sul, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://sei.ufms.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://sei.ufms.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3400830** e o código CRC **017F7521**.

**COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

Av Costa e Silva, s/nº - Cidade Universitária

Fone:

CEP 79070-900 - Campo Grande - MS

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a Deus, meu amparo nas adversidades.

À minha família pelo apoio.

Aos amigos da FAMEZ pelo incentivo.

À minha orientadora, Profa. Dra. Cassia Rejane Brito

Leal, que me conduziu nesta caminhada de

aprendizagem.

Agradeço a Professora Ana Camila Micheletti e a Dra.

Paola Dias de Oliveira pelo auxílio na produção e  
caracterização do óleo de girassol, colaboração essa que

foi essencial para condução da pesquisa;

Agradeço ao Professor Rodrigo Zaluski que gentilmente

cedeu a amostra de própolis usada no presente estudo

À Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

Ao Programa de Pós Graduação em Ciências

Veterinárias.

À Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

## Sumário

|                                                                                                                                                                                                       |     |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| LISTA DE TABELAS .....                                                                                                                                                                                | iv  |
| LISTA DE FIGURAS .....                                                                                                                                                                                | v   |
| RESUMO.....                                                                                                                                                                                           | vi  |
| ABSTRACT.....                                                                                                                                                                                         | vii |
| CAPÍTULO 1.....                                                                                                                                                                                       | 9   |
| 1. INTRODUÇÃO .....                                                                                                                                                                                   | 9   |
| 2.OBJETIVOS.....                                                                                                                                                                                      | 10  |
| 2.1.Objetivo geral .....                                                                                                                                                                              | 10  |
| 2.2. Objetivos específicos.....                                                                                                                                                                       | 10  |
| 3. REVISÃO DE LITERATURA .....                                                                                                                                                                        | 11  |
| 3.1. O gênero <i>Staphylococcus</i> .....                                                                                                                                                             | 11  |
| 3.2. A espécie <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> .....                                                                                                                                           | 11  |
| 3.3. Emergência da resistência aos antimicrobianos .....                                                                                                                                              | 13  |
| 3.4. Própolis .....                                                                                                                                                                                   | 15  |
| 3.5. Potencial Antimicrobiano da própolis.....                                                                                                                                                        | 16  |
| 3.6. Óleo De Girassol Ozonizado .....                                                                                                                                                                 | 18  |
| 3.7. A aplicabilidade do óleo de girassol ozonizado.....                                                                                                                                              | 20  |
| 4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....                                                                                                                                                                   | 22  |
| 5. CAPÍTULO 2 .....                                                                                                                                                                                   | 27  |
| AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DA PRÓPOLIS EM <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> MULTIDROGA RESISTENTE ISOLADOS DE OTITE E PIODERMITE SUPERFICIAL DE CÃES .....                   | 27  |
| 6. CAPÍTULO 3 .....                                                                                                                                                                                   | 44  |
| AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA IN VITRO DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO EM <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> MULTIDROGA RESISTENTE ISOLADOS DE OTITE E PIODERMITE SUPERFICIAL DE CÃES ..... | 44  |
| 7. ANEXOS .....                                                                                                                                                                                       | 63  |

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 2

Tabela 1. Valores da concentração inibitória mínima para o grupo controle.....37

### CAPÍTULO 3

Tabela 2. Índice de acidez, iodo e peróxido no óleo de girassol puro e ozonizado  
.....48

Tabela 3. Resultados da avaliação da concentração inibitória mínima em 48 isolados  
*S. pseudintermedius* MDR. ....51

Tabela 4. Resultados da avaliação da concentração inibitória mínima para cepas  
controle. ....52

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 2

|                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 1. Perfil de resistência dos isolados de <i>S. pseudintermedius</i> a sete classes de antimicrobianos. ....                                                                                                                                                                                                                                                                                              | 32 |
| Figura 2. Resultado da avaliação de sensibilidade aos compostos antimicrobianos e suas classes para amostras de <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> .. ....                                                                                                                                                                                                                                                  | 34 |
| Figura 3. (a) Distribuição dos valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) em 48 isolados <i>S. pseudintermedius</i> MDR. (b) Médias ( $\pm$ dp) da concentração inibitória mínima em função do tempo de incubação pela ação do extrato de própolis. Os pontos em vermelho atrás das médias e desvios padrão representam os valores brutos, e a área em cinza é a densidade da distribuição dos pontos..... | 37 |

### CAPÍTULO 3

|                                                                                                                                                                                               |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| Figura 4 Representação dos fragmentos estruturais de triacilglicerol encontrados nos óleos vegetais .....                                                                                     | 49 |
| Figura 5 A) Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de OG-00; B) Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da região de 5,8 – 5,0 ppm do OG-00; C) Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de OG-00..... | 50 |
| Figura 6A) Espectro de RMN de $^1\text{H}$ de OG-12; B) Expansão do espectro de RMN de $^1\text{H}$ da região de 5,8 – 5,0 ppm de OG-12; C) Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ de OG-12.....  | 51 |

1 ZILIO, A. L. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DA  
2 PRÓPOLIS E ÓLEO OZONIZADO EM *Staphylococcus pseudintermedius*  
3 MULTIDROGA RESISTENTE ISOLADO DE OTITE E PIODERMITE  
4 SUPERFICIAL DE CÃES 2022. Mestrado- Programa de Pós-Graduação em  
5 Ciências Veterinárias. Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia,  
6 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS. 2022.

## RESUMO

7  
8  
9  
10 Dentre os problemas que afetam os animais de companhia, as dermatopatias de  
11 origem bacteriana apresentam alta incidência na rotina do tratamento clínico em  
12 Medicina Veterinária. Devido o fenômeno crescente da resistência dos micro-  
13 organismos aos antimicrobianos, as poucas opções terapêuticas convencionais  
14 para tratamento de cães e gatos e objetivando amenizar os efeitos nocivos dessas  
15 afecções cutâneas, a busca por terapias com compostos de origem natural tem-se  
16 mostrado uma alternativa. O objetivo neste trabalho foi avaliar a ação inibitória *in*  
17 *vitro* do extrato alcoólico da própolis marrom a 30% e do óleo de girassol ozonizado  
18 frente a *Staphylococcus pseudintermedius* multirresistentes provenientes de casos  
19 clínicos de dermatites e otites em cães. Os compostos foram testados em 48  
20 isolados da bactéria, por meio da técnica de microdiluição em caldo. Foram usadas  
21 diluições dos compostos variando de 1,5% a 100% de concentração. Para verificar  
22 a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis, 48 isolados foram expostos a dois  
23 tempos de ação, 1 hora e 24 horas, e testados para determinar a Concentração  
24 Inibitória Mínima (CIM). A própolis com ação em 1 hora demonstrou a variação da  
25 concentração inibitória entre 12,5% e 75% e com ação em 24 horas entre 1,5% e  
26 50%. O efeito bactericida ocorreu em ambos os tempos. Para o óleo ozonizado a  
27 CIM variou entre 3% e 50%. Conclui-se que ambos os compostos, tem ação  
28 inibitória sobre isolados de *S. pseudintermedius* multidroga resistentes, podendo  
29 constituir alternativa futura a terapêutica de infecções superficiais de pele.

30 Palavras-chave: Ação antimicrobiana, animais de companhia, ozônio, resistência

31  
32  
33  
34

## ABSTRACT

Among the problems that affect companion animals, dermatoses of bacterial origin have a high incidence in the routine of clinical treatment in Veterinary Medicine. Due to the growing phenomenon of resistance of microorganisms to antimicrobials, the few conventional therapeutic options for the treatment of dogs and cats and aiming to reduce the harmful effects of these skin disorders, the search for therapies with compounds of natural origin has been shown an alternative. The objective of this work was to evaluate the in vitro inhibitory action of the alcoholic extract of brown propolis (30%) and ozonated sunflower oil against multidrug-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical cases of dermatitis and otitis in dogs. The compounds were tested on 48 bacterial isolates, using the broth microdilution technique. Dilutions of compounds ranging from 1.5% to 100% concentration were used. To verify the in vitro antimicrobial activity of propolis, 48 isolates were exposed to two action times of 1 hour and 24 hours and tested to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The propolis with action in 1 hour presented the variation of the inhibitory concentration between 12.5% and 75% and with action in 24 hours between 1.5% and 50%. The bactericidal effect occurred in both times. For ozonated oil, the MIC ranged between 3% and 50%. It is concluded that both compounds have an inhibitory action on multidrug-resistant *S. pseudintermedius* isolates, which may constitute a future alternative for the treatment of superficial skin infections.

## CAPÍTULO 1

### 1. INTRODUÇÃO

Os distúrbios no tecido cutâneo constituem uma das ocorrências mais frequentes na clínica de animais de estimação ou *pets*. Essas alterações podem apresentar-se em formas restritas ou disseminadas em diversas partes do corpo, além de ter etiologia multifatorial, a exemplo: alergia alimentar, alergia atópica, provocadas por picaduras de pulgas, por ectoparasitas, enfermidades parasitárias sistêmicas, tumores ou outras dermatopatias.

Os cães são os mais acometidos, porém os gatos também estão sujeitos a essas alterações dermatológicas. As lesões na pele são classificadas utilizando critérios clínicos que abrangem a observação macroscópica e histopatológica, que, a depender da profundidade do acometimento da derme pode-se diferenciar em: piodermite externa, piodermite superficial e piodermite profunda (CONCEIÇÃO; FABRIS, 2000).

Dentre as causas infecciosas, o principal agente etiológico envolvido nas afecções cutâneas em cães é o *Staphylococcus pseudintermedius*, apesar de ser considerado parte da microbiota dos animais, em condições clínicas normais. Quando a estrutura da pele é danificada e combinando alguns fatores predisponentes, a microbiota pode tornar-se patogênica dando início ao processo infeccioso, que é um dos principais motivos para o uso de antimicrobianos (CODNER e RHODES, 2003; MARINHO, 2020).

O uso indiscriminado de antimicrobianos contribuiu consideravelmente para o aumento da resistência bacteriana. A taxa de insucesso dos tratamentos atualmente é um problema recorrente e a procura de opções terapêuticas a partir de compostos naturais tornou-se uma busca emergente (MARINHO, 2020).

Dentre os compostos apontados como promissores, de acordo com Codner e Rhodes (2003) e Marinho (2020), é conhecido que própolis e óleos ozonizados são opções viáveis do ponto de vista terapêutico e econômico, porém, ainda há necessidade de estudos ampliados que determinem quais componentes são

responsáveis pela eficácia destes produtos, possíveis toxicidades e a capacidade de ação frente a grupos bacterianos específicos, a fim de desenvolver as formulações terapêuticas mais seguras.

Considerando que as afecções da derme compõem importante parte da casuística na clínica de animais de companhia e que estudos prévios utilizando compostos naturais permanecem em evidência, objetivou-se com este estudo delinear o perfil *in vitro* da eficácia da utilização do extrato alcoólico da própolis marrom e do óleo de girassol ozonizado frente a isolados de *S. pseudintermedius* multirresistentes, oriundos de processos infecciosos superficiais de pele e orelha de cães.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial antibacteriano do extrato alcoólico da própolis e do óleo de girassol ozonizado sobre isolados de *S. pseudintermedius* multirresistentes, oriundos da orelha e da pele de cães.

### 2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar fenotipicamente, pela técnica de disco-difusão, isolados multirresistentes de *S. pseudintermedius* provenientes de processos clínicos de dermatite e otite canina;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato alcóolico de própolis marrom a 30%, produzida no município de Terenos, MS, sobre isolados *S. pseudintermedius*, em dois diferentes tempos de exposição;
- Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de girassol ozonizado por 12 horas, sobre isolados de *S. pseudintermedius*.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 O gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é constituído por cocos Gram-positivos que se assemelham a cachos de uvas e por vezes podem ser visualizados em forma de células isoladas, em pares, tétrades e cadeias curtas. Os membros desta espécie são em sua maioria aeróbicos facultativos, catalase positiva e não apresentam motilidade e nem esporulação (WINN, JR. et al., 2010). Crescem bem em meios de cultura básicos, são halófilos moderados e algumas espécies podem fermentar manitol e produzir hemolisinas, além de outras exotoxinas. Suas diferenças genotípicas e processos patogênicos permitem a classificação em 84 espécies e 30 subespécies conhecidas atualmente (BOND; LOEFFLER, 2012; PARTE et al., 2020).

Essas bactérias são encontradas colonizando a pele e mucosas, sem causar maiores prejuízos para saúde humana e animal, quando em condições clínicas normais, como também, são capazes de atingir alta patogenicidade em condições propícias, como quebra das barreiras cutâneas ou a redução nos níveis de imunidade (ALVAREZ; LABARCA; SALLES, 2010).

Os principais fatores de virulência, que permitiram definir os membros do gênero entre espécies patogênicas e oportunistas são: produção da enzima coagulase, presença de cápsula, produção de toxinas hemolíticas, enterotoxinas, lipases, proteases e a presença de proteína M na parede celular (MCVEY; KENNEDY; CHENGAPPA, 2016).

A produção da enzima bacteriana coagulase já foi considerada durante muito tempo o principal fator de virulência presente em *Staphylococcus aureus*, *S. pseudintermedius*, *S. schleiferi* e *S. hyicus*. Contudo, alguns estafilococos que não produzem coagulase ainda são virulentos e o grau de resistência a antimicrobianos entre as diversas espécies do gênero, incluindo espécies coagulase negativa, modificou o espectro de interesse médico (GONZÁLEZ-MARTÍN et al., 2020).

#### 3.2 A espécie *Staphylococcus pseudintermedius*

Os cocos Gram-positivos com certas características bioquímicas provenientes de animais eram classificados como *Staphylococcus aureus*, que foi considerada a única espécie patogênica por muito tempo. Hájek em 1976 descreveu o *Staphylococcus intermedius*, isolado a partir de amostras oriundas de cavalos, cães, pombos e martas, baseado na observação fenotípica, atividade bioquímica, composição da parede celular e determinação do conteúdo de DNA. Havia ainda um grau de heterogeneidade fenotípica entre as cepas, relacionado até certo ponto à origem da espécie hospedeira (QUINN et al., 1994).

Um dos métodos utilizados no passado para diferenciar *S. aureus* do *S. intermedius* era o teste de resistência ou sensibilidade ao antimicrobiano polimixina B. Amostras resistentes à polimixina B eram classificadas como *S. aureus* e as sensíveis como *S. intermedius* (QUINN et al., 1994). Na atualidade esta classificação é falha, pois, muitos isolados são resistentes a este composto.

O status taxonômico permaneceu inquestionável até a descrição do *Staphylococcus pseudintermedius* por Devriese et al. (2005), denominado desta forma pela semelhança fenotípica ao *S. intermedius*. A partir daí foi adotada uma classificação taxonômica com a diferenciação de mais três espécies bacterianas, *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. pseudintermedius* que juntos foram denominados SIG (*Staphylococcus intermedius group*). Cada uma delas foi associada a processos infecciosos de espécies animais diferentes, *S. delphini* a infecções cutâneas purulentas de golfinhos, *S. intermedius* em isolados de pombos e *S. pseudintermedius* como agente etiológico de piodermites em cães (SASAKI et al., 2007; DEVRIESE et al., 2009).

*S. pseudintermedius* é encontrado colonizando a microbiota natural dos cães e gatos, com presença mais contundente nas regiões das narinas, cavidade oral, anus e virilha. É consenso entre autores que em isolados cutâneos oriundos de cães, o agente patogênico deve ser classificado como *S. pseudintermedius*. O termo SIG é utilizado para isolados de outros hospedeiros na ausência de exames moleculares para identificação, pois, os membros deste grupo não apresentam diferenças claras entre si, inclusive nos testes bioquímicos (BANNHOER; GUARDABASSI, 2012; BOND; LOEFFLER 2012).

A presença de genes codificadores de toxinas como: citotoxinas, toxinas esfoliativas e pirogênicas em *S. pseudintermedius* confere a eles o aumento da virulência, permitem uma maior adesão aos queratinócitos (células diferenciadas

que compõe o tecido epitelial) e podem causar uma exacerbada resposta imune causada pelas proteínas bacterianas ou superantígenos, desencadeando um processo de hipersensibilidade no animal. As proteínas bacterianas podem causar uma série de sintomas como febre, náusea, vômitos, diarreia e algumas vezes choque e até mesmo a morte (MANDERS, 1998; HENDRICKS et al., 2002; PITCHENIN, 2016).

Esta espécie já foi descrita como causadora de infecções esporádicas em outras espécies animais bem como foi relatada a ocorrência de processos infecciosos em humanos, o que evidencia seu potencial zoonótico (VAN HOOVELS et al., 2006; STEGMANN et al., 2010; WEESE e VAN DUIJKEREN, 2011).

### 3.3 Emergência da resistência aos antimicrobianos

Historicamente, para controlar as infecções bacterianas, a terapia antimicrobiana era adotada de maneira empírica, as opções eram restritas a poucas propostas terapêuticas, porém, em sua maioria, havia sucesso. Com o passar do tempo, isolados resistentes a mais de uma classe de antimicrobianos começaram a ser identificados, bem como foram sendo desvendados os mecanismos responsáveis pela resistência bacteriana (GUZMÁN-BLANCO et al., 2009).

Na tentativa de resolver ou minimizar os problemas colocados por esse fato, novas classes de antimicrobianos foram desenvolvidas e dentre elas foi criado o betalactâmico sintético derivado da penicilina e nomeado por meticilina. A meticilina apresentava resistência à ação das betalactamases, que no momento era uma característica desejável para burlar a ação das enzimas bacterianas que degradam o antibiótico (LIMA et al., 2015).

Contudo, na década de 60, a resistência ao inovador composto sintético foi identificada em *S. aureus*, denominada como MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*). *S. aureus* é o patógeno humano relacionado a causa mais comum de infecções nosocomiais, também responsável por infecções comunitárias e elevados índices de morbidade e mortalidade (SANTOS et al., 2007; GUZMÁN-BLANCO et al.; 2009; LIMA et al., 2015).

Na medicina veterinária *S. pseudintermedius* (o mais comum causador de piodermites e otites em cães) resistente à meticilina (SPMR), é relatado desde a década de 80, e assim como em *S. aureus*, o gene que confere esta resistência é

o gene *mecA*. A hipótese dessa ocorrência é que por meio do contato estreito e frequente do homem e seus animais de estimação houve a troca das informações genéticas entre as cepas. Hoje a identificação de MRSP em amostras clínicas de animais já está consolidada e estudos têm evidenciado o aumento da resistência também para outras classes de antimicrobianos como: fluoroquinolonas, macrolídeos, aminoglicosídeos e tetraciclinas (SASAKI et al., 2007; KADLEC et al., 2010; VAN DUIJKEREN et al., 2011).

Huerta e colaboradores (2010), descreveram que cães criados em habitat urbano, com histórico de antibioticoterapia, representam um risco significativo de serem portadores de isolados resistentes a meticilina e a outros antibióticos, o que limita consideravelmente a escolha do tratamento antimicrobiano na clínica veterinária.

Segundo Perreten e colaboradores (2010), em estudo que determinou o genótipo e fenótipo do perfil de resistência do *S. pseudintermedius* (MRSP), bem como sua distribuição geográfica na Europa e América do Norte, esta bactéria vem acumulando genes de resistência independente da sua região geográfica e está claro que é um patógeno nosocomial em medicina veterinária, assim como *S. aureus* na medicina humana. Considera também que as pessoas que trabalham com animais tornam-se portadores destes estafilococos resistentes podendo contribuir para a disseminação da MRSP na população animal e humana.

Não é um consenso universal a classificação bacteriana como multirresistente, Schwarz e colaboradores (2010) sugerem que, se realizado apenas o teste de sensibilidade fenotípica e identificado a resistência para três ou mais classes de antimicrobianos seja adotado o termo multirresistência. Se realizados testes complementares de análise molecular devemos adotar a descrição multirresistência analisada a nível molecular (SCHWARZ et al., 2010).

O perfil de multirresistência adquirido pelas bactérias, associado ao uso crescente e inadvertido dos antimicrobianos, reduz as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de processos infecciosos mais severos ou recorrentes na medicina veterinária. As afecções cutâneas ou otológicas são ocorrências frequentes na clínica de pequenos animais com índices que representam entre 20 e 75% dos atendimentos (HILL et al., 2006).

Dentre os agentes envolvidos nos processos, *S. pseudintermedius* é uma causa comum e relevante, conforme descrito anteriormente, com potencial patogênico

conferido pelos fatores de virulência e seu perfil de resistência elevado aos antimicrobianos (HILL et al., 2006).

Sendo assim, a alternativa do uso de terapias não medicamentosas convencionais e de aplicação tópica seria uma estratégia para minimizar essas afecções cutâneas, não apenas como coadjuvantes, mas sim como tratamento único.

### 3.4 Própolis

A própolis é produzida pelas abelhas e é resultante da coleta de diversas substâncias extraídas dos vegetais acrescidas de enzimas salivares. Isso dá origem a um material com aspecto resinoso que é utilizado no cotidiano das abelhas para proteger e estruturar a colmeia. Este produto é encontrado revestindo as paredes da colmeia e suas propriedades químicas oriundas da sua origem vegetal a tornam bastante versátil oferecendo inclusive proteção contra a ação de microrganismos. Na composição da própolis encontramos desde ceras, resinas, óleos essenciais, bálsamos aromáticos e microelementos e vitaminas como: alumínio, cálcio, estrôncio, ferro, cobre, manganês, magnésio, silício, titânio, bromo, zinco, B1, B2, B6, C e E (BANKOVA; CASTRO; MARCUCCI, 2000; PARK et al., 2002; CASTALDO; CAPASSO, 2002; SFORCIN; BANKOVA, 2011).

A coloração e odor característico e variável da própolis está intimamente relacionada com a ecologia da flora e regiões visitadas pelas abelhas. Para identificar a fonte vegetal da própolis, o indicador mais eficiente é o exame analítico da composição química, confrontada com a provável fonte vegetal de onde foi extraída. A correta identificação da proveniência geográfica e, acima de tudo, a origem vegetal associada à fenologia da planta apícola tem suma importância para um controle preciso relativo à qualidade e até mesmo à padronização das amostras de própolis (PARK et al., 2002; FERRAZ, 2020).

Diversos trabalhos foram desenvolvidos demonstrando essa variedade que também confere a própolis a diversificação nos compostos químicos e suas atividades terapêuticas. Alguns componentes ocorrem somente em própolis derivadas de espécies particulares de plantas, como é o caso da própolis taiwanesa, que apresenta grande concentração de ácidos fenólicos e flavonoides,

em que se verifica intensa atividade antioxidante (CHEN et al., 2003; VARGAS et al., 2004).

Em contraponto, a própolis verde nativa do Brasil, e só encontrada aqui, mais especificamente na região de Minas Gerais, não contém flavonoides na sua composição estrutural; mas apresenta altas concentrações de benzofurano, elemento dotado de propriedades com acentuada atividade citotóxica (SALATINO et al., 2005).

No Oeste da Ásia, na Europa e na América do Norte a própolis é obtida a partir do exsudado do botão de álamo (*Populus sp.*) de maneira dominante. Na América do Sul a dificuldade da correlação entre a própolis e sua origem botânica ocorre pela vasta variedade vegetal que possibilita a coleta de material pelas abelhas. No Brasil, esta grande variedade permitiu a classificação de doze grupos de própolis até o momento, sendo, cinco grupos na região Sul, um grupo no Sudeste e seis no Nordeste com características físico-químicas diferentes (PARK et al., 2002).

Administrada sob diversas formas, o uso da própolis é seguro e menos tóxico que muitos medicamentos sintéticos. É um dos diversos produtos naturais utilizados durante séculos pela humanidade, havendo registros entre os assírios, gregos, romanos, incas e egípcios. De acordo com a literatura consultada, data de 1700 A.C (Egito antigo e Mesopotâmia) os dados históricos da utilização da própolis pelo homem, na época conhecida como “cera negra” e muito empregada no processo de embalsamação dos mortos (MAZZUCO, 1996; CASTALDO; CAPASSO, 2002;; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

No que diz respeito às propriedades biológicas, a própolis tem ações antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomodulatórias, hipotensivas, cicatrizantes, anestésicas, anticânceres, anti-HIV e anticariogênicas. Suas propriedades obviamente estão ligadas a composição química, neste contexto, por apresentar uma composição heterogênea de substâncias ativas, vem sendo estudada e representa uma importante matéria prima para muitos produtos de saúde, constituindo uma vasta e interdisciplinar área de pesquisa (PARK et al., 2002; SILVA et al., 2007).

### **3.5 Potencial Antimicrobiano da própolis**

A atividade antimicrobiana da própolis e seu maior ou menor grau de inibição em relação às diferentes espécies bacterianas, tem sido descrita e associada a fatores como: técnica de extração, metodologia e condução dos ensaios, local de origem da própolis, época do ano que foi produzida e principalmente a ao alto índice de substâncias tipo flavonoides presentes em sua composição. Tem se revelado altamente inibitória para determinados gêneros, tais como *Bacillus*, *Mycobacterium*, *Streptococcus* e *Staphylococcus*, e por vezes parcialmente efetiva ou inativa em relação a outros gêneros como *Escherichia* spp, *Pseudomonas* spp, *Klebsiella* spp, *Proteus* spp e *Salmonella* spp (SINHORINI et al., 2015; GRANGE; DAVEY, 1990; MAZZUCO et al., 1996).

Fernandes e colaboradores (2006) em estudo sobre atividade antimicrobiana de própolis de *Apis mellifera*, obtidas em três regiões do Brasil, demonstraram que houve maior sensibilidade das bactérias Gram positivas e leveduras em relação às Gram negativas. Verificaram também que houve diferença na atividade antimicrobiana em função do local de produção e que isso se refletiu na diferença de composição química da própolis.

Heimbach e colaboradores (2016), analisando os efeitos da inoculação do resíduo da extração das própolis verde e marrom como inibidor bacteriano *in vitro* em amostras de *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus intermedius*, obtidas de processos infecciosos de animais, além de amostras bacterianas ATCC de *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* e *Klebsiella pneumoniae*, sugerem maior eficácia sobre as bactérias Gram-positivas e menor eficiência ou mesmo ineficácia sobre as bactérias Gram-negativas.

Segundo diversos autores (LU et al., 2005, MAGALHÃES; LOT; DEL CARRATORE, 2016; SANTANA et al., 2011) a própolis é efetiva contra bactérias Gram-positivas especialmente contra *S. aureus*.

Gomes e colaboradores (2016) avaliaram a atividade antibacteriana *in vitro* da própolis marrom, produzida em Terenos, Estado de Mato Grosso do Sul, em bactérias provenientes de processos clínicos infecciosos de animais domésticos e concluiu que a própolis marrom tem ação bactericida, em função da espécie da bactéria e da procedência animal.

Considerando a resistência bacteriana como um fenômeno biológico natural e que o desenvolvimento da resistência ocorre por maneiras diferentes,

principalmente por mutação direta e aquisição de genes de resistência por meio de conjugação, ao se incluir um novo antimicrobiano em alguma prática clínica, rapidamente os laboratórios de microbiologia já detectam cepas resistentes. O amplo e, algumas vezes indiscriminado, uso dessas drogas resulta nesta seleção (ANDREOTTI; NICODEMO, 2004).

O uso de antimicrobianos de maneira inapropriada tem demonstrado ser contraproducente e é consenso entre diversos pesquisadores que os antibióticos estão associados a episódios danosos à saúde pública e ao meio ambiente. A busca de elementos naturais com potencial terapêutico tem se mostrado cada vez mais necessária e é interessante que mesmo a própolis, já consagrada e portadora de diversas propriedades biológicas, continue a ser testada frente aos novos desafios bacterianos.

### 3.6 Óleo De Girassol Ozonizado

O ozônio é um gás presente na troposfera, altamente oxidante que pode ser produzido de duas maneiras: naturalmente através dos raios ultravioleta do sol que em interação com as moléculas de oxigênio ( $O_2$ ) quebram seus átomos, estes unem-se a novas moléculas de oxigênio e formam o ozônio ( $O_3$ ) e artificialmente utilizando um gerador, cuja ação na produção do ozônio ocorre a partir da passagem de oxigênio puro por uma descarga elétrica de alta voltagem e alta frequência realizando um processo similar ao natural (RUBIN, 2003; LIMA; FELIX; CARDOSO, 2021).

Em termos químicos é um alótropo triatômico do oxigênio ( $O_3$ ) e sua denominação deve-se à palavra grega *ozein* (cheiro), isso porque o ozônio exala um odor bem peculiar. As propriedades deste gás são descritas como: potente agente desinfetante, bactericida, fungicida, viricida, capaz de ativar o sistema enzimático, melhorar as propriedades hematológicas e circulatórias. Seu maior potencial de atuação é resultante da sua capacidade oxidante, que, com ação direta nos micro-organismos reage primeiro na parede celular da bactéria e, depois, ao se inserir na estrutura interna da célula, oxida os aminoácidos e ácidos nucleicos (HADDAD et al., 2009; TRAVAGLI et al., 2010; MARTINS et al., 2012).

Chamamos de ozonólise o processo ao qual os óleos são submetidos às condições de ozonização para ter como produto um óleo ozonizado, ou seja, que

este óleo em sua composição química passe a ser portador de moléculas de ozônio em forma de ozonídeos. A reação das cadeias de ácidos graxos insaturados e a modificação estrutural das moléculas permite também a formação de peróxidos de hidrogênio e de outros peróxidos orgânicos. Portanto, ao final deste processo, são gerados muitos componentes que irão conferir ao produto inicial diversas características químicas que podem ser benéficas e à exemplo disso temos o potencial antimicrobiano (ALMEIDA et al., 2013; CARDOSO et al., 2021).

As sementes do girassol (*Helianthus annuus L.*) dão origem a um óleo com grande qualidade nutricional, rico em lipídeos e proteínas. Por meio dos processos tecnológicos usados na extração e refino do óleo pode-se classificá-los como: refinado, semi-refinado e bruto, sendo que no processo de extração a frio é possível preservar a maior integridade do óleo, pois as sementes não são submetidas a outros tratamentos que não lavagem, decantação, centrifugação e filtração (CORREIA et al., 2014).

As características físico-químicas e a composição de ácidos graxos determinam a qualidade do óleo. A Anvisa, segundo a resolução nº 481/2021 e IN nº 87/2021, estabelece a lista de espécies vegetais autorizadas, as designações, a composição de ácidos graxos e os valores máximos de acidez e de índice de peróxidos para óleos e gorduras vegetais. Na Farmacopeia Brasileira o óleo de girassol está descrito como excipiente farmacotécnico, ou seja, é uma substância que pode ser empregada com finalidade específica adicionadas às formulações farmacêuticas que embora sem ação farmacológica carregam os farmoquímicos para os organismos a que se destinam humano ou veterinário (CORREIA et al., 2014).

O processo de ozonólise do óleo de girassol e sua caracterização foi descrita por vários autores (DÍAZ et al., 2001; DÍAZ et al., 2005; DÍAZ et al., 2006; SORIANO; MIGO; MATSUMURA, 2003 a e b; TELLEZ; LOZANO; GÓMEZ, 2006; ALMEIDA et al., 2013). Os índices de acidez (IA), índice de iodo (II) e índice de peróxido (IP) são técnicas analíticas de verificação da qualidade de óleo.

O IA representa a quantidade de ácidos graxos livres na amostra e o índice de iodo (II) é uma técnica que permite quantificar as insaturações presentes no óleo. Essa técnica mede a quantidade de  $I_2$  consumido em 100g de amostra e depende de vários fatores, como a quantidade de duplas ligações carbono-carbono, condições de armazenamento e processos de oxidação (ALMEIDA et al., 2013). Como o ozônio reage nas duplas ligações formando os ozonídeos, o número de

insaturações dos ácidos graxos vai diminuindo, levando, consequentemente, à diminuição do índice de iodo, conforme informam Almeida e colaboradores (2013).

O índice de peróxido representa a quantidade de peróxido expresso em miliequivalentes de oxigênio ativo por quilo de amostra (Almeida, 2013). Consequentemente, a formação desses compostos oxigenados, os ozonídeos, faz com o IP aumente (MARTÍNEZ SÁNCHEZ; PÉREZ-DAVISON; HORWAT DELAPORTE, 2012).

É possível observar que o maior tempo de reação do ozônio com óleo e a adição de água no processo de ozonização conferem melhores resultados. Portanto, o efeito antibacteriano do óleo ozonizado está correlacionado com as condições de ozonização às quais os óleos são submetidos (CARDOSO et al., 2021).

### **3.7 A aplicabilidade do óleo de girassol ozonizado**

A diversidade de uso do óleo de girassol está vinculada a sua composição que possui uma alta concentração de ácido linoleico (48-74%), seguida por ácido oleico (14-39%) e uma menor quantidade de ácido linolênico e outros ácidos graxos presentes em sua estrutura. Quando vislumbramos tratar o epitélio, o ácido linoleico ( $\omega$ -6 ou n-6) e o ácido linolênico ( $\omega$ 3 ou n-3) são os mais importantes (MOREIRA; CURI, MANCINI FILHO, 2002; ZANARDI et al., 2008; FERREIRA et al., 2012).

A associação das propriedades reparadoras teciduais contidas nos óleos e a propriedade bactericida do ozônio tem resultado em avanços no tratamento de cicatrização feridas quando comparadas a abordagem convencional utilizando produtos não naturais, apontam estudos desenvolvidos em medicina humana e veterinária (KHAN et al., 2018; SANCHES, 2011; REIS, 2019).

No estudo de Moureu e colaboradores (2015), foram testados óleos de girassol com composição clássica e outro com alto teor oleico, em tempos de ozonização de 1-7h e ozonizados com e sem água. Os óleos utilizados demonstraram efeito *in vitro* contra as três principais espécies bacterianas responsáveis pela mastite bovina, *S. aureus*, *E. coli* e *Streptococcus uberis*. O óleo ozonizado com água teve um melhor desempenho e a condição de ozonização demonstrou ter influência significativa sobre a atividade antibacteriana.

Delgado (2015), relata que é habitual na consulta veterinária casos crônicos e recorrentes de otite e piodermites causadas por fungos e especialmente pela

levedura *Malassezia pachydermatis*, que coloniza orelhas e pele de cães e gatos. A partir desta constatação, conduziu um estudo com 25 casos clínicos divididos em dois grupos, otites e piodermites com presença confirmada desta levedura e os tratou topicamente com óleo de girassol ozonizado durante 15 dias. Foi observada melhora clínica de todos os casos em torno de 80% e demonstrada a eficácia do óleo sobre *M. pachydermatis*.

Em pesquisa sobre o uso de óleos *in natura* e ozonizados, Guimarães; de Oliveira e Kozusny-Andreani (2020) testaram a eficácia destes no controle *in vitro* de *Sporothrix schenckii*, agente etiológico da esporotricose, uma infecção que acomete humanos e vários animais, considerada emergente em vários países e de difícil tratamento pois exige uso sistêmico e prolongado de antifúngicos. Como resultado, concluíram que, dentre os óleos testados, o de girassol ozonizado foi um dos mais eficazes no controle do *S. schenckii*, demonstrando a possibilidade de ser utilizado como alternativa de tratamento.

De forma corrente as formulações com óleo ozonizado têm sido mais largamente empregadas para inibição de fungos e leveduras. Seu potencial antibacteriano já foi descrito, porém estudos com grupos bacterianos específicos precisam ser melhor investigados e a expansão científica que reforça as concentrações de ozônio empregadas nas formulações oleosas para tratamento de afecções de pele ainda são escassas e necessárias.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, Nathália R. *et al.* Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: a review. **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 4, n. 4, 18 jan. 2013.
- ALVAREZ, Carlos.; LABARCA, Jaime.; SALLES, Mauro. Prevention strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 107-108, dez. 2010.
- ANDREOTTI, R.; NICODEMO, M. L. F. **Uso de antimicrobianos na produção de bovinos e desenvolvimento da resistência.** - Portal Embrapa. Disponível em: <<https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/320735/uso-de-antimicrobianos-na-producao-de-bovinos-e-desenvolvimento-da-resistencia>>. Acesso em: 25 maio 2022.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **IN Nº 87**, de 15 de março de 2021 - DOU - Imprensa Nacional. Disponível em: <<https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-87-de-15-de-marco-de-2021-309008143>>. Acesso em: 02 de Maio 2022.
- ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **IN Nº 481**, de 15 de março de 2021 - DOU - Imprensa Nacional. <<https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-481-de-15-de-marco-de-2021-309012789>>. Acesso em: 02 de Maio 2022.
- BANKOVA, Vassya S.; CASTRO, Solange L. de.; MARCUCCI, Maria C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, jan. 2000.
- BANNOEHR, Jeanette; GUARDABASSI, Luca. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 253—e52, 19 abr. 2012
- BOND, R.; LOEFFLER, A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 3, p. 147-154, 17 jan. 2012.
- CARDOSO, Irlaine da Conceição Costa *et al.* Potencial antimicrobiano de óleos vegetais ozonizados frente a espécies bacterianas: uma revisão integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e22410212451, 13 fev. 2021
- CASTALDO, Stefano.; CAPASSO, Francesco. Propolis, an old remedy used in modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. S1—S6, nov. 2002.
- CHEN, Chia-Nan *et al.* Cytotoxic prenylflavanones from taiwanese propolis. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 4, p. 503-506, abr. 2003
- CODNER, E. C.; RHODES, K. H. Pioderma In: TILLEY, L.P.; SMITH, F.W.K.JR. **Consulta veterinária em 5 minutos - Espécies canina e felina**. 2ª. ed. São Paulo. v. 2. p.1136- 1137, 2003.
- CONCEIÇÃO, L. G.; FABRIS, V. E. Piodermite Canina: etiopatogênese, diagnóstico e terapia antimicrobiana sistêmica. **Revista Cães e Gatos**, v. 86, ano 14, p. 21 – 28. 2000.
- CORREIA SILVA, Iara Michelle *et al.* Avaliação das potencialidades e características físico-químicas do óleo de Girassol (*Helianthus annuus* L.) e Coco (*Cocos nucifera* L.) produzidos no Nordeste brasileiro. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3, 2014.

- 531 DELGADO, Miguel Ángel Hormigo. Efficacy therapeutic of the sunflower oil  
532 ozonated against *Malassezia pachydermatis* en infection in dogs and cats. **Revista**  
533 **Española de Ozonoterapia**, v. 5, n. 1, p. 55-74, 2015.
- 534 DEVRIESE, Luc A. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* sp. nov., a coagulase-  
535 positive species from animals. **International Journal of Systematic and**  
536 **Evolutionary Microbiology**, v. 55, n. 4, p. 1569-1573, 1 jul. 2005.
- 537 DEVRIESE, Luc A. *et al.* *Staphylococcus pseudintermedius* versus *Staphylococcus*  
538 *intermedius*. **Veterinary Microbiology**, v. 133, n. 1-2, p. 206-207, jan. 2009.
- 539 DÍAZ, Maritza *et al.* Spectroscopic characterization of ozonides with biological  
540 activity. **Ozone: Science & Engineering**, v. 23, n. 1, p. 35-40, jan. 2001.
- 541 DÍAZ, Maritza F. *et al.* Spectroscopic characterization of ozonated sunflower  
542 oil. **Ozone: Science & Engineering**, v. 27, n. 3, p. 247-253, jun. 2005.
- 543 DÍAZ, Maritza F. *et al.* Study of ozonated sunflower oil using 1h NMR and  
544 microbiological analysis. **Ozone: Science & Engineering**, v. 28, n. 1, p. 59-63, fev.  
545 2006.
- 546 FERNANDES JÚNIOR, Ary *et al.* Atividade antimicrobiana de própolis de *Apis*  
547 *mellifera* obtidas em três regiões do Brasil. **Ciência Rural**, v. 36, n. 1, p. 294-297,  
548 fev. 2006.
- 549 FERREIRA, Adriano Menis *et al.* Utilização dos ácidos graxos no tratamento de  
550 feridas: uma revisão integrativa da literatura nacional. **Revista da Escola de**  
551 **Enfermagem da USP**, v. 46, n. 3, p. 752-760, jun. 2012.
- 552 GOMES, Maria F. F. *et al.* Atividade antibacteriana *in vitro* da própolis  
553 marrom. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 279-282, abr. 2016.
- 554 GONZÁLEZ-MARTÍN, Margarita *et al.* Virulence factors in coagulase-positive  
555 *staphylococci* of veterinary interest other than *Staphylococcus aureus*. **Veterinary**  
556 **Quarterly**, v. 40, n. 1, p. 118-131, 1 jan. 2020.
- 557 GRANGE, J. M.; DAVEY, R. W. Antibacterial properties of propolis (bee  
558 glue). **Journal of the Royal Society of Medicine**, v. 83, n. 3, p. 159-160, mar.  
559 1990.
- 560 GUIMARÃES, Nara Moraes.; DE OLIVEIRA, Izabela Fernandes.; KOZUSNY-  
561 ANDREANI, Dora Inés. Eficácia de óleos vegetais in natura e ozonizados no  
562 controle de *Sporothrix schenckii*. **International Journal of Development**  
563 **Research**, v. 10, n. 11, p. 41970-41974, 24 nov. 2020.
- 564 GUZMÁN-BLANCO, Manuel *et al.* Epidemiology of meticillin-resistant  
565 *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **International Journal of**  
566 **Antimicrobial Agents**, v. 34, n. 4, p. 304-308, out. 2009.
- 567 HADDAD, M. A. *et al.* Comportamento de componentes bioquímicos do sangue em  
568 equinos submetidos à ozonioterapia. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária**  
569 **e Zootecnia**, v. 61, n. 3, p. 539-546, jun. 2009.
- 570 HAJEK, V. *Staphylococcus intermedius*, a new species isolated from  
571 animals. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 26, n. 4, p. 401-  
572 408, 1 out. 1976.
- 573 HEIMBACH, Natália da Silva *et al.* Resíduo da extração de própolis como inibidor  
574 bacteriano in vitro. **Revista Brasileira de Saúde e Produção Animal**, v. 17, n. 1,  
575 p. 65-72, abr. 2016.
- 576 HENDRICKS, Anke *et al.* Frequency of superantigen-producing *Staphylococcus*  
577 *intermedius* isolates from canine pyoderma and proliferation-inducing potential of  
578 superantigens in dogs. **Research in Veterinary Science**, v. 73, n. 3, p. 273-277,  
579 dez. 2002.

- HILL, P. B. *et al.* Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. **Veterinary Record**, v. 158, n. 16, p. 533-539, 22 abr. 2006.
- HUERTA, Belén *et al.* Risk factors associated with the antimicrobial resistance of *staphylococci* in canine pyoderma. **Veterinary Microbiology**, v. 150, n. 3-4, p. 302-308, jun. 2011.
- KADLEC, K. *et al.* Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1826-1828, 9 jun. 2010.
- KHAN, Sardar Ali *et al.* Ozone therapy for diabetic foot. **Medical Gas Research**, v. 8, n. 3, p. 111, 2018.
- LIMA, Máira Ferreira Pinto *et al.* *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares – Revisão de literatura. **Uningá Review**, v. 21, n. 1, 2015.
- LIMA, Manoel; FELIX, Erika; CARDOSO, Arnaldo. Aplicações e implicações do ozônio na indústria, ambiente e saúde. **Química Nova**, 2021.
- LU, Li-Chang; CHEN, Yue-Wen; CHOU, Cheng-Chun. Antibacterial activity of propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 213-220, jul. 2005.
- MAGALHÃES, Thaís Vendramini; LOT, Rômulo Francis Estangari; DEL CARRATORE, Carlos Rossi. Análise da ação antibacteriana da própolis e padronização de volumes através de antibiograma. **Revista Unimar Ciências**, v. 25, n. 1-2, 2016.
- MANDERS, Steven M. Toxin-mediated streptococcal and staphylococcal disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, n. 3, p. 383-398, set. 1998.
- MARINHO, Carolina Pereira. **Resistência a antibióticos em *Staphylococcus spp.* isolados de cães com otite externa e piodermite superficial**. 2020. Dissertação de Mestrado — Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2020.
- MARTINS, Andara *et al.* Efeito bactericida do gerador de alta frequência na cultura de *Staphylococcus aureus*. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 19, n. 2, p. 153-157, jun. 2012.
- MAZZUCO, H. *et al.* Utilização da própolis e álcool etílico no controle de *Salmonella* em rações avícolas. **Scientia Agricola**, v. 53, n. 1, jan. 1996.
- MCVEY, D. Scott; KENNEDY, Melissa; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 617 p.
- MOREIRA, Nara Xavier; CURI, Rui; MANCINI FILHO, Jorge. Ácidos graxos: uma revisão. **J. Brazilian Soc. Food Nutr**, v. 24, p. 105-123, dez. 2002.
- MOUREU, Sophie *et al.* Ozonation of sunflower oils: impact of experimental conditions on the composition and the antibacterial activity of ozonized oils. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 186, p. 79-85, fev. 2015.
- PARK, Yong Kun *et al.* Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai: evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997-1003, dez. 2002.
- PARTE, Aidan C. *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5607-5612, 1 nov. 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>. Acesso em: 7 jun. 2022.

- PEREIRA, Alberto dos Santos; SEIXAS, Fernando Rodrigues Mathias Silva; AQUINO NETO, Francisco Radler de. Propolis: 100 anos de pesquisa e suas perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, maio 2002.
- PERRETEN, V. *et al.* Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1145-1154, 25 mar. 2010.
- PITCHENIN, Letícia Camara. **Ocorrência de genes de citotoxinas, toxinas esfoliativas e pirogênicas em isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* de espécies domésticas e silvestres**. 2016. Dissertação de mestrado - Universidade Federal de Mato Grosso, [s. l.], 2016.
- QUINN, P. *et al.* **Clinical veterinary microbiology**. [s. l.]: Wolfe, 1994. ISBN 0723417113.
- REIS, Filho Nazilton de Paula. **Comparação entre diferentes ondas de laser e óleo de girassol ozonizado na epitelização de enxertos cutâneos aplicados em feridas recém criadas de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) I**. 2019. Text — Jaboticabal, [s.l.], 2019.
- RESOLUÇÃO RDC nº 481, DE 15 DE março DE 2021 - DOU - imprensa nacional. Disponível em: [resolução 481/2021](#). Acesso em: 25 maio 2022.
- RUBIN, Mordecai B. The history of ozone. part III. **Helvetica Chimica Acta**, v. 86, n. 4, p. 930-940, abr. 2003.
- SALATINO, Antonio *et al.* Origin and chemical variation of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1, p. 33-38, 2005.
- SANCHEZ, Maria Del Pilar Rodriguez. **Estudo histomorfológico e histomorfométrico da reparação tecidual na alveolite provocada em ratos tratada por óleo ozonizado**. 2011. Published Version — Universidade de São Paulo, [s. l.], 2011.
- SANTANA, Henrique Freitas *et al.* Bactericidal activity of ethanolic extracts of propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 485-491, 17 jul. 2011.
- SANTOS, André Luis dos *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007.
- SASAKI, T. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a veterinary teaching hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1118-1125, 31 jan. 2007.
- SASAKI, T. *et al.* Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2770-2778, 27 jun. 2007.
- SCHWARZ, Stefan *et al.* Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained from animals. **Veterinary Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 1-4, fev. 2010.
- SFORCIN, José Maurício; BANKOVA, Vassya. Propolis: is there a potential for the development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-260, jan. 2011.
- SILVA, Bruno B. *et al.* Chemical composition and botanical origin of red propolis, a new type of brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

- SINHORINI, Wellington Augusto *et al.* Atividade antibacteriana in vitro da própolis testada em cepas bacterianas padrão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 2, p. 107, 14 mar. 2015.
- SORIANO, Nestor U.; MIGO, Veronica P.; MATSUMURA, Masatoshi. Functional group analysis during ozonation of sunflower oil methyl esters by FT-IR and NMR. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 126, n. 2, p. 133-140, dez. 2003.
- SORIANO, Nestor U.; MIGO, Veronica P.; MATSUMURA, Masatoshi. Ozonation of sunflower oil: spectroscopic monitoring of the degree of unsaturation. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 10, p. 997-1001, out. 2003.
- STEGMANN, R. *et al.* Human infection associated with methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 9, p. 2047-2048, 1 jul. 2010.
- TELLEZ, Goitybell Martinez; LOZANO, Oscar Ledea; GÓMEZ, Maritza F. Díaz. Measurement of peroxidic species in ozonized sunflower oil. **Ozone: Science & Engineering**, v. 28, n. 3, p. 181-185, jul. 2006.
- TRAVAGLI, Valter *et al.* Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile of human blood. **International Journal of Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 165-174, mar. 2010.
- VAN DUIJKEREN, E. *et al.* Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 12, p. 2705-2714, 19 set. 2011.
- VAN HOOVELS, L. *et al.* First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection in a human. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4609-4612, 18 out. 2006.
- VARGAS, Agueda Castagna de *et al.* Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, fev. 2004.
- WEESE, J. Scott; VAN DUIJKEREN, Engeline. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 418-429, jan. 2010.
- WINN JR, Washington C. *et al.* **Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Tradução: Eiler Fritsch Toros. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. ISBN 978-85-277-1377-1.
- ZANARDI, Iacopo *et al.* Physico-Chemical characterization of sesame oil derivatives. **Lipids**, v. 43, n. 9, p. 877-886, 5 ago. 2008.

## 5 CAPÍTULO 2

### Artigo

(Artigo formatado segundo as normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

### AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DA PRÓPOLIS EM *Staphylococcus pseudintermedius* MULTIDROGA RESISTENTE ISOLADOS DE OTITE E PIODERMITE SUPERFICIAL DE CÃES

#### Resumo

O presente estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade *in vitro* de *S. pseudintermedius* multidroga resistente (MDR) frente ao extrato alcoólico de própolis marrom a 30%, obtido na região de Terenos/MS. Para verificar a atividade antimicrobiana *in vitro* da própolis, 48 isolados foram submetidos à técnica de microdiluição em placa, com concentrações de própolis variando de 100 a 1,5%. A exposição foi avaliada em dois tempos de ação 1hora/24 horas e testados para determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM). A própolis com ação em 1 hora demonstrou a variação da CIM entre 12,5% e 75% e com ação em 24 horas 1,5% e 50%, o efeito bactericida ocorreu em ambos os tempos. A média das concentrações inibitórias mínimas foi de 30,7 ( $\pm 14,2$ ) para ação em 1 hora e 18,6 ( $\pm 13,9$ ) na ação em 24 horas, indicando uma diferença média significativa (GLMM Gamma:  $\chi^2 = 19.33$ ,  $P \leq 0.001$ ). Esta correlação contribuiu para a validação da teoria de que um maior tempo de contato é necessário para resultados mais eficientes frente a amostras de *S. pseudintermedius* MDR.

**Palavras-chave:** atividade antimicrobiana, cães, perfil antimicrobiano, própolis marrom, resistência.

#### Abstract

The present study aimed to evaluate the *in vitro* sensitivity of multidrug resistant *S. pseudintermedius* (MDR) against the alcoholic extract of brown propolis (30%) obtained in the region of Terenos/MS. To verify the *in vitro* antimicrobial activity of propolis, 48 isolates were submitted to the microdilution plate technique, with propolis concentrations ranging from 100 to 1.5%. Exposure was evaluated at 1 hour/24 hour action times and tested to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). Propolis with action in 1 hour

showed a variation of MIC between 12.5% and 75% and with action in 24 hours 1.5% and 50%, the bactericidal effect occurred at both times. The mean minimum inhibitory concentrations were 30.7 ( $\pm 14.2$ ) for action at 1 hour and 18.6 ( $\pm 13.9$ ) for action at 24 hours, indicating a significant mean difference (GLMM Gamma:  $\chi^2 = 19.33$ ,  $P \leq 0.001$ ). This correlation contributed to the validation of the theory that a longer contact time is necessary for more efficient results against *S. pseudintermedius* MDR samples.

**Key words:** Antimicrobial activity, dogs, antimicrobial profile, brown propolis, resistance.

## Introdução

Em cães os processos bacterianos que acometem orelha e pele (otite e piodermites superficiais) são um problema recorrente e responsáveis por cerca de 20 a 75% dos atendimentos clínicos em medicina veterinária. Os principais agentes envolvidos nestes processos infecciosos são as bactérias do gênero *Staphylococcus* que têm apresentado uma elevada taxa de resistência aos antimicrobianos disponíveis para o tratamento de animais de companhia (Hill *et al.*, 2006; Marinho, 2020).

Os fatores de virulência como: produção de coagulase, presença de cápsula, produção de toxinas hemolíticas, enterotoxinas, lipases, proteases e a presença de proteína M na parede celular dos *Staphylococcus* spp. permitiram definir os membros do gênero entre espécies patogênicas e oportunistas e determinam o seu potencial para causar infecções (Mcvey *et al.*, 2016). *S. pseudintermedius*, é reconhecido como principal agente em isolados oriundos de otites e piodermites superficiais em cães (Bond e Loeffler 2012; Bannhoer e Guardabassi, 2012).

A detecção de cepas do *S. pseudintermedius* resistentes a muitas classes de antimicrobianos (multidroga resistentes – MDR) já foi descrita, bem como seu potencial zoonótico e é consenso que a transmissão interespecie é fator determinante para o desenvolvimento de cepas multirresistentes (Weese e Van Duijkeren, 2011; Kadlec e Schwarz, 2012;).

A necessidade de minimizar o uso ou até mesmo substituir o uso dos fármacos antimicrobianos é uma preocupação mundial. Pesquisas com compostos naturais apontam a própolis como detentora de um grande potencial biológico que pode agir em sinergismo com fármacos e também atuar isoladamente apresentando ampla variedade de propriedades devido a sua complexa composição química. A ação antimicrobiana da própolis sobre

bactérias Gram-positivas é descrita como mais efetiva se comparada às Gram-negativas (Marcucci *et al.*, 2001; Lustosa *et al.*, 2008).

Estudos com a finalidade de apontar compostos naturais com capacidade antibacteriana têm sido objeto de grande interesse por parte dos cientistas. Considerando a importância clínica das piodermites e otites na casuística de atendimentos em clínicas de pequenos animais e o aumento da detecção da multirresistência do mais comum agente causador de distúrbios cutâneos, o objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade de isolados do *S. pseudintermedius* MDR frente a ação bactericida do extrato alcoólico da própolis marrom.

## **Material e Métodos**

### **Amostras**

As bactérias utilizadas no estudo foram provenientes da coleção biológica, do Laboratório de Bacteriologia (LABAC) da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (FAMEZ/UFMS). Esta coleção está cadastrada no SISGEN sob o número C69392 e as amostras selecionadas foram obtidas de processos clínicos infecciosos superficiais de pele e orelha em cães domésticos. Estas amostras foram classificadas como *S. pseudintermedius* após realização de análises morfológicas e características bioquímicas em meios específicos, além da fonte animal original de isolamento.

Foram usadas 48 amostras de *S.pseudintermedius* MDR, caracterizado o perfil de resistência por meio da análise das fichas clínicas e laudos de exames. A técnica usada pelo laboratório para os testes de sensibilidade a antimicrobianos (TSA) é a técnica de disco difusão, conforme orientação do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Marinho, 2020) e classificados segundo a metodologia proposta por Schwarz *et al.*, 2010. Todas as 48 amostras foram testadas para: Gentamicina, amoxicilina-clavulanato, cefovecina, cefalexina, azitromicina, polimixina B, enrofloxacina, norfloxacina, sulfazotrim e doxiciclina.

As amostras bacterianas, inicialmente mantidas congeladas, foram reativadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e o teste de pureza e viabilidade realizado em agar BHI e agar manitol salgado. Foram escolhidas algumas colônias bem isoladas que foram repicadas em caldo Mueller Hinton. A padronização do inóculo foi realizada pela equiparação da turvação do repique com o tubo 0,5 da escala de Mac Farland, que

corresponde ao número de  $1,5 \times 10^8$  bactérias/mL. Esse inóculo foi usado para avaliar o potencial inibitório do extrato alcoólico da própolis.

### **Obtenção do extrato da própolis marrom**

A própolis bruta foi coletada nos meses de novembro do ano de 2018 a março de 2019 a partir de 15 colmeias da abelha *Apis mellífera*, instaladas no Apiário Experimental da Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, situada no município de Terenos/MS, 20°26'34''S 54°50'27''O, com 530,7 m de altitude. A região tem como fontes vegetais as plantas apícolas da região *Cecropia pachystachya*, *Mangifera indica*, *Tabebuia caraíba*, e *Vernonia polyanthes* e sua classificação foi definida em estudo de Gomes *et al.*, (2016).

Para obtenção do extrato etanólico a 30%, o material resultante da coleta mensal foi pesado em quantidades iguais e homogeneizado em liquidificador para obtenção de um *pool*, a metodologia aplicada está descrita na Instrução Normativa nº 3, de 19/01/2001, do Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (Brasil, 2001). Posteriormente foi filtrada em papel de filtro, obtendo-se uma solução estoque a qual foi armazenada em frasco âmbar e conservada em temperatura ambiente.

O extrato etanólico de própolis marrom utilizado possui parâmetros físico-químicos (cera, resíduo seco, fenóis e flavonoides totais) que atendem as especificações adotados pela legislação brasileira vigente e avaliados segundo a metodologia descrita por Funari e Ferro (2006).

### **Atividade antibacteriana do extrato alcoólico de própolis em uma hora e vinte e quatro horas**

A atividade antibacteriana do extrato alcoólico de própolis marrom foi investigada por meio da determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), pela técnica de sensibilidade por microdiluição em caldo, segundo protocolo descrito por Winn Junior e colaboradores (2010), com modificações.

O extrato previamente preparado foi testado na concentração inicial (300.000 µg/ml) e diluído sucessivamente em caldo Muller Hinton (MH), utilizando microplacas, nas proporções 225.000µg/ml, 150.000 µg/ml, 75.000 µg/ml, 37.500 µg/ml, 18.750 µg/ml, 9.375 µg/ml e 4.685 µg/ml. A cada diluição adicionou-se 10 µL do inóculo bacteriano.

As placas de microtitulação de 96 poços contendo inóculo, e as diferentes concentrações do extrato diluídas, foram incubadas em estufa a 37°C por uma hora. Após esta etapa todos os poços foram semeados em placas de ágar MH as quais foram incubadas a 37°C **overnight**. A leitura das placas foi realizada pela observação do crescimento das colônias. As mesmas placas de microtitulação de 96 poços contendo inóculo, e as diferentes concentrações do extrato, foram mantidas incubadas em estufa a 37°C por 24 horas +/-6h. Novamente todos os poços foram semeados em placas de agar BHI e incubadas a 37°C **overnight**. A leitura das placas foi realizada pela observação do crescimento das colônias. Foi considerada eficiente a menor concentração na qual não houve qualquer tipo de crescimento bacteriano.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata, empregando como controles uma cepa *S. aureus* (ATCC 25923), um isolado clínico *S. pseudintermedius* não MDR. Também foi feito controle da viabilidade do inóculo, possível ação inibitória do solvente da própolis (álcool de cereais) e a esterilidade do extrato.

### **Análise de dados**

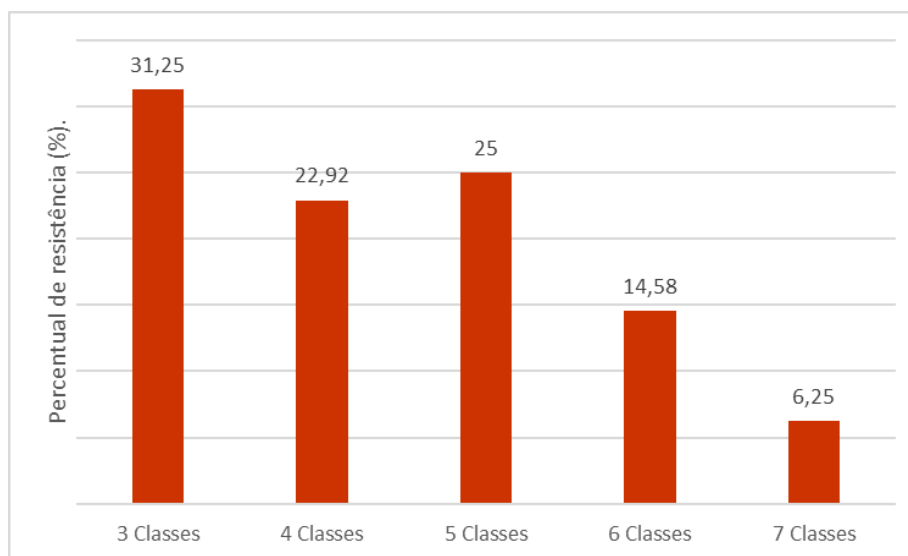
Para determinar se ocorreu diferença média significativa na Concentração Inibitória Mínima pela ação do extrato de própolis em dois tempos distintos (uma hora e 24 horas após o período de incubação) foram construídos Modelos Gerais Linearizados Mistos (GLMM, função glmmPQL, pacote MASS, Venables e Ripley, 2002). Esse método de análise foi escolhido devido ao argumento na função [correlation=corAR1()] que faz a correção para dados repetidos no tempo, desta forma, controlando possíveis efeitos de autocorrelação temporal. Foi utilizada a distribuição de erros Gamma devido os valores da MIC serem contínuos e positivos. Esta análise foi feita em ambiente R de programação (R Core Team 2022).

### **Resultados e Discussão**

#### **Perfil de resistência das amostras *S.pseudintermedius* MDR.**

A análise das fichas e laudos de exames, realizados previamente pelo LABAC, permitiu determinar o perfil de resistência e sensibilidade dos isolados às classes dos antimicrobianos. Verificou-se que: 31,25% deles foram resistentes a três classes de antimicrobianos, 22,92% a quatro classes, 25,00% a cinco classes, 14,58% a seis classes e

874 6,25% a sete classes. O resultado do perfil de resistência às classes antimicrobianas testadas  
875 está demonstrado na Fig.1.



876

877 **Figura 1 Perfil de resistência dos isolados de *S. pseudintermedius* a sete classes de**  
878 **antimicrobianos. (01) Aminoglicosídeos, (02)  $\beta$ - lactâmicos, (03) Macrolídeos, (04) Polipeptídeos, (05)**  
879 **Quinolonas, (06) Sulfonamidas+ trimetoprima e (07) Tetraciclina. Valores %**

880 Quanto à caracterização do perfil de resistência do *S.pseudintermedius* MDR para os  
881 fármacos antimicrobianos e suas respectivas classes, a prevalência da resistência para classe  
882 das tetraciclina (Doxiciclina/ DOX) 93,75% já é apontada de maneira recorrente em  
883 medicina veterinária e pode-se afirmar que esta classe antimicrobiana não possui valor  
884 terapêutico quando direcionada para tratamento de otite e piodermite superficiais em cães.  
885 A resistência de uma cepa bacteriana a qualquer um dos membros da classe pode resultar em  
886 resistência cruzada às outras tetraciclina, portanto, é muito provável que os isolados  
887 resistentes à doxiciclina sejam também resistentes à oxitetraciclina (Brunton *et al.*, 2010;  
888 Marinho, 2020).

889 A elevada resistência às sulfonamidas associada a trimetoprima (Sulfazotrim/ SUT),  
890 encontrada nos isolados de *S. pseudintermedius* (85,42%) também foi descrita por Giacoboni  
891 *et al.*, (2017). Esta resistência pode ser adquirida por mutação aleatória ou relacionada a  
892 presença e transferência de plasmídeos (fragmentos de DNA auto- replicantes) que  
893 propiciam a propagação de fatores de resistência (fator R). Os genes de resistência podem  
894 ser acumulados nos plasmídeos e a transferência e propagação da informação pode ocorrer  
895 inclusive entre diferentes gêneros e espécies bacterianas (Tortora *et al.*, 2005, p.240-241;  
896 Kadlec e Schwarz, 2012).

897 A resistência às quinolonas (Enrofloxacina/ EN, norfloxacina/ NOR) 79,17% e aos  
898 macrolídeos (azitromicina / AZT) 60,42% é amplamente relatada para estafilococos. Para as

quinolonas ainda não existem mecanismos de inativação descritos e apesar de apresentarem boa atividade contra estafilococos são inativas em cepas resistentes à meticilina e se utilizadas isoladamente são menos eficazes. Já os macrolídeos segundo Brunton *et al.*, (2010) não podem mais ser usados de modo confiável, a não ser que a sua sensibilidade *in vitro* tenha sido documentada.

O perfil de resistência detectado nas amostras de *S. pseudintermedius* corrobora com a afirmação de diversos autores sobre os elevados índices de resistência às várias classes de antimicrobianos (Van Duijkeren *et al.*, 2011; Kadlec e Schwarz, 2012).

A sensibilidade detectada para os  $\beta$ -lactâmicos, em primeiro para amoxicilina + ácido clavulânico/AMC, conflui com estudo de Marinho (2020) e pode ser atribuído à ação ampliada desta penicilina que associada ao inibidor da betalactamase age de maneira semelhante às cefalosporinas, tanto é que, para cefalexina (CFE) e cefovecina (CFV) as amostras também demonstraram sensibilidade. Estes fármacos atuam inibindo a síntese do peptidoglicano e agem em outras proteínas de ligação da penicilina (PBP) interferindo na divisão, conformação e outros processos essenciais. De maneira geral esta classe de antimicrobiano é mais ativa nas bactérias em fase logarítmica de crescimento.

Sobre a sensibilidade a polipeptídeos 75% (polimixina/ POL), estes fármacos apresentam características moleculares específicas, alta nefrotoxicidade e são indicados apenas para terapias tópicas, eles interagem com fosfolípidos e aumentam a permeabilidade das membranas, já os aminoglicosídeos são direcionados para terapia de agentes gram-negativos, não devem ser utilizados como medicação única para infecções causadas por Gram-positivos e se associados a ativos que agem contra a parede celular produzem efeito bactericida contra estafilococos (Brunton *et al.*, 2010).

Considerando o mecanismo de ação dos compostos os quais as amostras apresentaram maior resistência, pode-se afirmar que para os isolados de *S. pseudintermedius* caracterizados neste estudo, as tetraciclinas, sulfonamidas associada a trimetoprima, macrolídeos e quinolonas não são opções terapêuticas válidas, bem como polipeptídeos e aminoglicosídeos. Restando apenas a classe dos  $\beta$ -lactâmicos como capazes de apresentar alguma ação antimicrobiana satisfatória sobre estas amostras MDR.

Os resultados do perfil de suscetibilidade dos 48 isolados de *S. pseudintermedius* MDR oriundos de afecções de orelha e pele de cães estão representados na Fig. 2.

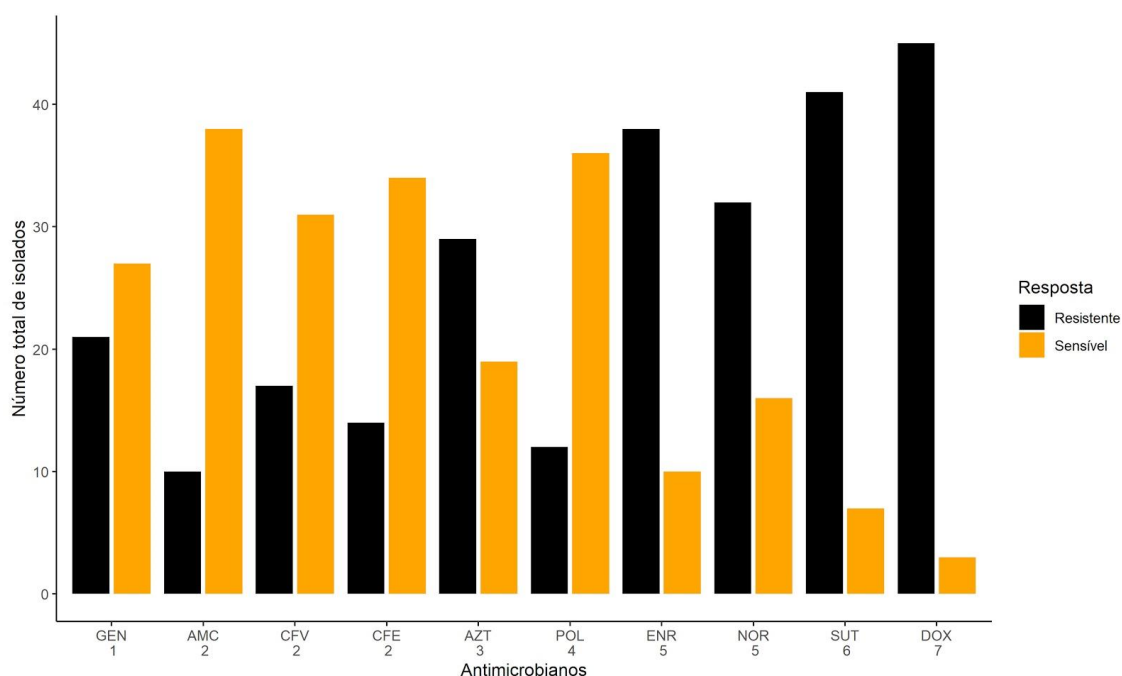


Figura 2. Resultado da avaliação de sensibilidade aos compostos antimicrobianos para amostras de *Staphylococcus pseudintermedius*. GEN: gentamicina , AMC: amoxicilina + ácido clavulânico, CFV: cefovecina, CFE: cefalexina, AZT: azitromicina, POL: polimixina, EN: enrofloxacino, NOR: norfloxacina, SUT: sulfazotrim, DOX: doxiciclina. Valores em %.

### Extrato alcoólico de própolis

O extrato alcoólico de própolis (EAP) produzido na fazenda escola UFMS, município de Terenos, MS, utilizado neste estudo, foi previamente caracterizado por Gomes *et al.*, (2016) utilizando a metodologia descrita por Funari e Ferro (2006) e em conformidade com a legislação vigente (BRASIL, 2001). Os aspectos físicos como coloração, aspecto resinoso e rigidez permitiram caracterizar, indubitavelmente, como pertencente à variedade marrom.

Recentemente, trabalho efetuado com a própolis da mesma localização feito por Ferraz (2020), identificou a possível contribuição da *Cecropia pachystachya*, *Mangifera indica*, *Tabebuia caraiba*, e *Vernonia polyanthes* como principais fontes vegetais, relacionando compostos bioativos presentes nas plantas com os compostos encontrados no extrato e definindo seus principais constituintes: flavonóides, terpenóides e compostos fenólicos.

Segundo Machado *et al.*, (2016), que avaliaram composição química e atividade biológica de extratos de própolis marrom, verde e vermelha, de diferentes regiões do Brasil, há grande controvérsia em relação ao teor de flavonóides e geralmente os ácidos fenólicos são mais abundantes. Esse evento foi evidenciado por Gomes *et al.*, (2016) na caracterização

deste EAP que possui níveis de compostos fenólicos semelhantes a Buriol et al. (2009) contudo, nível de flavonóides superior.

Os dados de composição previamente descrita da própolis da Fazenda Escola/UFMS, estão em total concordância com perfil descrito sobre a composição química geral da própolis brasileira, a qual é considerada a mais extensivamente estudada. Mesmo considerando a grande extensão territorial do país, os estudos com própolis revelam que a variedade marrom contém a presença de galangina, pinocembrina, crisina, apigenina e pinobanksina, sendo todos esses compostos pertencentes a categoria dos flavanóides (ZULHENDRI *et al.*, 2021).

O EAP a 30% deste estudo adota as características físicas e químicas pré-estabelecidas que permanecem como primeiras descritas para própolis da região de Terenos/MS e as análises quantitativas acerca da composição química ainda não foram realizadas. Porém, considerando que a área destinada a manutenção do apiário está em uma reserva de cerrado, e que não houve alteração significativa na flora local nas últimas décadas, presume-se a manutenção do perfil bioquímico da própolis obtida da região, conforme indicado pelos estudos de composição química realizados nos últimos anos (Gomes et al., 2016; Ferraz, 2020).

### **Testes de inibição pelo extrato alcoólico de própolis**

Quanto a atividade biológica do EAP é consenso que a ação da própolis é mais efetiva em bactérias Gram-positivas e esta atividade está atribuída a constituição da parede bacteriana que para os micro-organismos Gram-positivos possui uma espessura de 50 a 100 moléculas de peptidoglicano, enquanto nas Gram-negativas esta espessura é de apenas uma ou duas moléculas (Marcucci *et al.*, 2001; Vargas *et al.*, 2004).

Outra possibilidade adicional já investigada sobre esse evento é o fato de que as bactérias Gram positivas possuem menor carga elétrica negativa em sua superfície, comparadas às Gram negativas, permitindo maior afinidade da própolis com essas células (HALDER et al., 2015)

Dos 48 isolados de *S. pseudintermedius* MDR submetidos a avaliação da ação da própolis nos dois tempos (1 e 24 horas), 32 (66,67%) apresentaram redução na MIC após maior tempo de incubação, 12 (25,00%) não apresentaram modificações nas concentrações obtidas inicialmente e 04 (8,33%) isolados demonstraram aumento da MIC no segundo

tempo. O resultado das concentrações inibitórias mínimas por amostra testada está demonstrado na Fig. 3 (a).

A concentração inibitória mínima obtida para ação do EAP frente aos 48 isolados de *S. pseudintermedius* MDR em 1 hora variou de 12,5% (37.500µg/mL) a 75% (225.000µg/mL), com média de 30,7% ( $\pm 14,2$ ). O maior número das amostras, totalizando 35 (72,92%) teve inibição em concentrações abaixo da média e a maior densidade de dados está representada por 29 (60,42%) isolados inibidos com MIC  $\leq 25$  conforme demonstrado na Fig. 3 (b).

Para ação em 24 horas a concentração inibitória mínima variou de 1,5% (4.685µg/mL) a 50% (150.000µg/mL), com média de 18,6 ( $\pm 13,9$ ). O total de 25 (52,09%) isolados foram inibidos em concentrações abaixo da média (representados na Fig.3 (b)). Estes resultados foram superiores aos apresentados por Gomes *et al.*, (2016) frente a bactérias do gênero *Staphylococcus* de procedência canina e bovina, com EAP oriundo da mesma localidade, porém com maior concentração (35%).

A média de concentração do EAP que teve efeito inibidor, 30,7 ( $\pm 14,2$ ) e 18,6 ( $\pm 13,9$ ) para tempos 1h e 24h, respectivamente, apresentou diferença significativa (GLMM Gamma:  $\chi^2 = 19.33$ ,  $P \leq 0.001$ , Fig. 3 b).

Esta diferença média significativa conflui com resultados de Picoli *et al.*, (2016) que analisaram a ação da própolis marrom da região sul do Brasil em micro-organismos causadores de mastite bovina, em diferentes tempos e concentrações inibitórias, obtendo resultados de eliminação para *Staphylococcus* spp. no tempo de exposição de duas horas na concentração de 25mg/mL, afirmando que a inibição é maior em função do tempo de exposição ao tratamento. Os dados deste estudo encontram-se na mesma faixa de inibição que demonstramos.

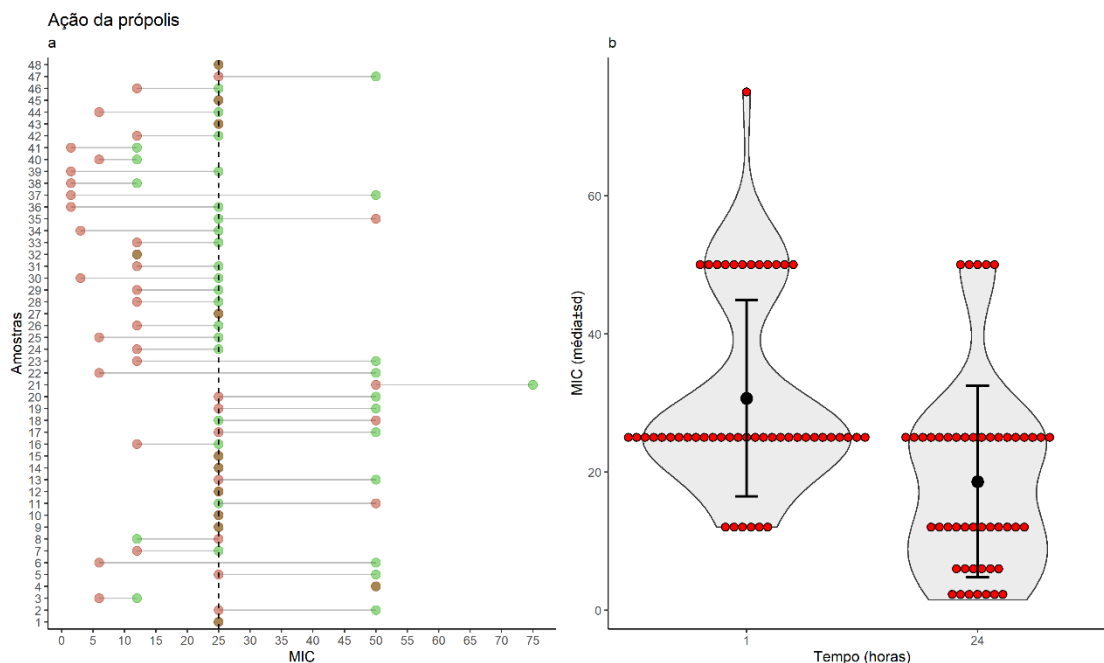


Figura 3 (a) Distribuição dos valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) em 48 isolados *S. pseudintermedius* MDR. Os círculos verdes correspondem à concentração inicial obtida no tempo 1, e os círculos rosa correspondem à concentração obtida no tempo 2. Um único círculo corresponde a ausência de variação na concentração inibitória mínima em função do tempo. (b) Médias ( $\pm$ dp) da concentração inibitória mínima em função do tempo de incubação pela ação do extrato de própolis. Os pontos em vermelho atrás das médias e desvios padrão representam os valores brutos, e a área em cinza é a densidade da distribuição dos pontos.

Para o grupo controle, *S. aureus* ATCC 25923 e *S. pseudintermedius* não MDR os valores da concentração inibitória mínima estão exibidos na Tab. 1 e pode-se afirmar que ambos foram inibidos em concentrações abaixo das médias obtidas para *S. pseudintermedius* MDR nos dois tempos de ação. O parâmetro comparativo deste resultado é mais relevante para ação em 24 horas, que é a metodologia aplicada nos estudos pela maioria dos autores.

Tabela 1. Valores da concentração inibitória mínima para o grupo controle de *Staphylococcus*. Valores em %

| Isolado                            | Própolis 1hora | Própolis 24 horas |
|------------------------------------|----------------|-------------------|
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923        | $\leq 25$      | $\leq 06$         |
| <i>S. pseudintermedius</i> não MDR | $\leq 25$      | $\leq 12$         |

Sinhorini *et al.*, (2014), para extrato de própolis comercial, referem sensibilidade para cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 de 0,25%, valor esse inferior ao resultado apresentado no presente estudo.

Dantas-Silva *et al.*, (2017) avaliaram as atividades biológicas da própolis verde, vermelha e marrom, produzidas em várias regiões do Brasil. A própolis marrom dos estados de SC, PR e RS não apresentaram bom desempenho para cepas ATCC de *S. aureus*, com valores inibitórios acima de  $>1000\mu\text{g/mL}^{-1}$ , mais uma vez indicando que fatores como tempo de ação, metodologia e a diversidade da composição química do EAP, dificultam os parâmetros comparativos, mesmo quando direcionados para cepas padrão. No estudo citado a própolis vermelha apresentou desempenho superior nos parâmetros avaliados. Em concordância com Machado *et al.*, (2016), pode-se supor que os compostos responsáveis pela ação antimicrobiana significativa sejam os constituintes fenólicos, pois, o EAP de própolis marrom comparado ao extrato da própolis vermelha apresenta menor ação antimicrobiana.

A atividade inibitória de um extrato de própolis, do estado da Bahia, foi avaliada por Santos *et al.*, (2019) frente a isolados de *Staphylococcus* de mastite caprina. Os autores testaram diferentes solventes e verificaram que o extrato alcóolico teve melhor desempenho que o extrato acetato e o hexânico. Esse estudo confirma que o tipo de processamento para obtenção e extração do composto própolis também tem influência direta sobre sua atividade biológica, podendo favorecer a atividade de alguns compostos em detrimento a outros. Neste caso, a extração alcóolica favoreceu a presença de compostos antibacterianos levando a inibição dos isolados com CIM que variou de 97-12500 $\mu\text{g/mL}$ .

Outro fator a se indicar sobre processamento dos extratos, e sua relação com eficiência, é o fator concentração inicial ou processada. Em geral os estudos são realizados com extratos cuja concentração inicial varia entre 25 a 35%. Em alguns trabalhos pode ser adotado o método de efetuar a concentração do extrato após sua obtenção, sendo esperado que, diante da diferença de processamento, ocorra variação na atividade biológica.

O EAP de própolis verde foi avaliado na inibição de *S. pseudointermedius*, de dois isolados clínicos de cães, em estudo realizado por Barbosa *et al.*, (2022). O estudo alcançou CIM de 0,156mg/mL para os dois isolados. Este valor indica que o referido EAP teve grande eficiência na inibição *in vitro*, sendo consideravelmente mais ativo que o extrato que avaliamos de própolis marrom. Os autores empregaram uma etapa de evaporação para concentração do extrato antes dos ensaios. Considerando esse processo, além da diferença na classificação da própolis, é possível perceber que a própolis possui identidade própria,

não sendo possível ter um padrão único de atividade biológica. Porém é possível, a partir do conhecimento de sua composição, empregar diferentes estratégias para otimização da eficiência. Isso pode incluir o tipo de formulação, diferentes veículos ou associação com outros compostos.

O diferencial no estudo aqui apresentado é o fato de que todas as amostras testadas, são de origem clínica e MDR. O EAP que foi avaliado, em geral, teve desempenho inferior se comparado a outros estudos realizados em outras regiões do país ou do mundo. Porém é importante notar que a maior resistência das amostras ao EAP pode ter correlação com a resistência prévia a antimicrobianos convencionais. Este não é um evento fácil de ser comprovado uma vez que o mecanismo exato de ação da própolis não está completamente elucidado. Há um consenso sobre alguns desses possíveis modos de ação, como por exemplo o aumento da permeabilidade de membrana, inibição da produção de ATP, redução da mobilidade bacteriana, alteração no potencial de membrana e interferência no processo de síntese de DNA e RNA (PRZYBYLEK e KARPISNKI, 2019; ALMUHAYAWI, 2020).

Considerando que amostras bacterianas MDR podem sofrer alterações estruturais, nota-se a necessidade de estudos complementares para aprofundar a investigação sobre a possibilidade de correlação entre aquisição de resistência a antimicrobianos e menor sensibilidade a ação de um composto que atua como a própolis.

O potencial terapêutico da própolis em formulações para uso tópico foi investigado *in vivo*, em estudo que avaliou seu efeito em cães portadores de otite, em tratamento durante 14 dias. O grupo controle, também portador da infecção, recebeu solução placebo, com a mesma frequência e pelo mesmo período de tempo. Ao comparar a evolução clínica e parâmetros de diagnóstico microbiológico, os autores constataram que houve eliminação da infecção no grupo teste (71%) em comparação ao grupo controle, no qual não houve recuperação de nenhum dos animais. O estudo também verificou a ausência de reações adversas, demonstrando segurança no uso da formulação (LOZINA *et al.*, 2010).

Importante destacar que todos os estudos empregando própolis nativa, contribuem para validar o potencial uso dessa substância no controle de infecções superficiais. No entanto, devemos observar que a própolis verde, assim como a vermelha, tem sua presença assinalada em regiões específicas no Brasil, dificultando o alcance amplo do seu uso. Dessa forma, ressaltamos que avaliar a própolis de forma regionalizada contribui para o conhecimento do seu potencial uso e possibilidades de aplicação em terapias direcionadas, gerando além dos benefícios diretos esperados, a possibilidade de se estabelecer uma cadeia de produção com impacto social e econômico.

Adicionalmente os testes em linhagens bacterianas de origem animal são escassos, a investigação da ação bacteriostática e bactericida, bem como a diversidade química da própolis marrom oriunda da região de Terenos/ MS podem ser objeto de estudos futuros.

### Conclusão

As cepas bacterianas de *S. pseudintermedius* MDR caracterizadas neste estudo apresentam elevado grau de resistência para as classes antimicrobianas comumente empregadas no tratamento de otite e piodermite superficial em cães.

A própolis marrom da região de Terenos/ MS apresenta potencial bactericida frente às amostras de *S. pseudintermedius* MDR e este potencial é ampliado em função do tempo de ação.

### Referências

- ALMUHAYAWI, M.S. Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi J. Biol. Sci.* 2020, 27, 3079–3086.
- BANNOEHR, Jeanette; GUARDABASSI, Luca. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 253—e52, 19 abr. 2012.
- BARBOSA, Eunice V. *et al.* *In vitro* comparison between antimicrobial and antibiofilm effects of Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* against *Staphylococcus pseudintermedius* isolate. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 3, 2022.
- BOND, R.; LOEFFLER, A. What 's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53, n. 3, p. 147-154, 17 jan. 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001. **Aprova os regulamentos técnicos de identidade e qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis** <https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal= 1 & pagina= 46 & data=23/01/2001>. Acesso em: 29/06/2022.
- BRUNTON, Laurence L. *et al.* **Goodman e Gilman' s: Manual de farmacologia e terapêutica**. 11. ed. Porto Alegre: AMGH, 2010. ISBN 978-85-63308-12-2.

- 1125 BURIOL, Lilian *et al.* Composição química e atividade biológica de extrato oleoso de  
 1126 própolis: uma alternativa ao extrato etanólico. **Química Nova**, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.
- 1127 CLSI. **Laboratory documents**: development and control; approved guideline. 5. ed. [S. l.]:  
 1128 Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. 85 p. ISBN 9781562386009.
- 1129 DANTAS SILVA, Rejane Pina *et al.* Antioxidant, antimicrobial, antiparasitic, and cytotoxic  
 1130 properties of various Brazilian propolis extracts. **PLOS ONE**, v. 12, n. 3, p. e0172585, 30  
 1131 mar. 2017.
- 1132 FERRAZ, Gabrielle Alves. **Avaliação do efeito da sazonalidade sobre os perfis químicos**  
 1133 **e propriedades biológicas de amostras de própolis produzidas pelas abelhas apis**  
 1134 **mellifera em Terenos-MS**. 2020. Trabalho de conclusão de curso - Universidade Federal  
 1135 de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2020.
- 1136 FUNARI, Cristiano S.; FERRO, Vicente O. Análise de própolis. **Ciência e Tecnologia de**  
 1137 **Alimentos**, v. 26, n. 1, p. 171-178, mar. 2006.
- 1138 GIACOBONI, Gabriela *et al.* Detección de *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes a  
 1139 meticilina y a otros antimicrobianos de uso habitual en la clínica en piodermias caninas.  
 1140 **Analecta Veterinaria**, v. 37, n. 2, p. 012, 26 dez. 2017.
- 1141 GOMESS, Maria F. F. *et al.* Atividade antibacteriana in vitro da própolis marrom. **Pesquisa**  
 1142 **Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 4, p. 279-282, abr. 2016.
- 1143 HALDER, S. *et al.* Alteration of Zeta potential and membrane permeability in bacteria: A  
 1144 study with cationic agents. Springerplus 2015, 4, 1–14.
- 1145 HILL, P. B. *et al.* Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological  
 1146 conditions in small animals in general practice. **Veterinary Record**, v. 158, n. 16, p. 533-  
 1147 539, 22 abr. 2006.
- 1148 KADLEC, Kristina; SCHWARZ, Stefan. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus*  
 1149 *pseudintermedius*. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 276— 55, 11 jun. 2012.
- 1150 LOZINA, L. A. *et al.* Efficacy of Argentine propolis formulation for topical treatment of  
 1151 canine otitis externa. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 6,  
 1152 p. 1359-1366, dez. 2010.
- 1153 LUSTOSA, Sarah R. *et al.* Própolis: atualizações sobre a química e a farmacologia. **Revista**  
 1154 **Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 447-454, set. 2008.
- 1155 MACHADO, Bruna Aparecida Souza *et al.* Chemical composition and biological activity of  
 1156 extracts obtained by supercritical extraction and ethanolic extraction of brown, green and  
 1157 red propolis derived from different geographic regions in Brazil. **PLOS ONE**, v. 11, n. 1, p.  
 1158 e0145954, 8 jan. 2016.

- 1159 MARCUCCI, M.C. *et al.* Phenolic Compounds from Brazilian Propolis with  
 1160 Pharmacological Activities, *Journal of Ethnopharmacology*, v.74, p.105-112, 2001.22
- 1161 MARINHO, Carolina Pereira. **Resistência a antibióticos em *staphylococcus* spp. isolados**  
 1162 **de cães com otite externa e piodermite superficial.** 2020. Dissertação de Mestrado —  
 1163 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2020.
- 1164 MCVEY, D. Scott; KENNEDY, Melissa; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia**  
 1165 **veterinária.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 617 p.
- 1166 PICOLI, T. *et al.* Caracterização química e ação antibacteriana de extrato de própolis  
 1167 marrom da região sul do Brasil. **Brazilian Journal of Veterinary Medicine**, v. 38, n. 4, p.  
 1168 365-371, 2016.
- 1169 PRZYBYŁEK, Izabela; KARPÍŃSKI, Tomasz M. Antibacterial properties of  
 1170 propolis. **Molecules**, v. 24, n. 11, p. 2047, 29 maio 2019.
- 1171 SANTOS, Heidy C. Dos *et al.* Antimicrobial activity of propolis extract fractions against  
 1172 *Staphylococcus* spp. isolated from goat mastitis. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 39,  
 1173 n. 12, p. 954-960, dez. 2019.
- 1174 R Core Team (2022). R: A language and environment for statistical computing. **R**  
 1175 **Foundation for Statistical Computing**, Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.
- 1176 SCHWARZ, Stefan *et al.* Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria obtained  
 1177 from animals. **Veterinary Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 1-4, fev. 2010.
- 1178 SINHORINI, Wellington Augusto *et al.* Atividade antibacteriana in vitro da própolis testada  
 1179 em cepas bacterianas padrão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde Pública**, v. 1, n. 2,  
 1180 p. 107, 14 mar. 2015.
- 1181 TORTORA, Gerard J.; FUNKE, Berdell R.; CASE, Christine L. **Microbiologia.** Tradução:  
 1182 Roberta Marchiori Martins. 8. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. ISBN 853630488.
- 1183 VAN DUIJKEREN, E. *et al.* Review on methicillin-resistant *Staphylococcus*  
 1184 *pseudintermedius*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 12, p. 2705-2714,  
 1185 19 set. 2011.
- 1186 VARGAS, Agueda Castagna de *et al.* Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato  
 1187 alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, fev. 2004.
- 1188 VENABLES, W. N. & Ripley, B. D. (2002) *Modern Applied Statistics with S.* Fourth  
 1189 Edition. Springer, New York. ISBN 0-387-95457-0.
- 1190 WEESE, J. Scott; VAN DUIJKEREN, Engeline. Methicillin-resistant *Staphylococcus*  
 1191 *aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary**  
 1192 **Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 418-429, jan. 2010.

- 1193 WINN JR, Washington C. et al. **Koneman, diagnóstico microbiológico**: texto e atlas  
1194 colorido. Tradução: Eiler Fritsch Toros. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.  
1195 ISBN 978-85-277-1377-1.
- 1196 ZULHENDRI, Felix *et al.* Antiviral, antibacterial, antifungal, and antiparasitic properties of  
1197 propolis: a review. **Foods**, v. 10, n. 6, p. 1360, 11 jun. 2021.
- 1198
- 1199
- 1200

## 6 CAPÍTULO 3

### Artigo

(Artigo formatado segundo as normas da revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia)

### **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO ÓLEO DE GIRASSOL OZONIZADO EM *Staphylococcus pseudintermedius* MULTIDROGA RESISTENTE ISOLADOS DE OTITE E PIODERMITE SUPERFICIAL DE CÃES**

#### **Resumo**

O ozônio é um gás cujas propriedades já foram descritas, podendo se destacar sua ação desinfetante, bactericida, fungicida, viricida, capaz de ativar o sistema enzimático e melhorar as propriedades hematológicas e circulatórias. Ao ser adicionado a um veículo oleoso é possível obter benefícios adicionais na terapia tópica de afecções. O presente estudo teve como objetivo avaliar a sensibilidade *in vitro* de *S. pseudintermedius* multidroga resistente (MDR) frente ao óleo de girassol ozonizado. Para verificar a atividade antimicrobiana *in vitro*, 48 isolados clínicos, oriundos de otite e piodermite de cães, foram submetidos à técnica de microdiluição em placa, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). O óleo de girassol submetido ao processo de ozonólise por 12 horas, foi diluído em concentrações de 100 a 1,5%. As amostras submetidas ao teste com o óleo foram inibidas com CIM que variou entre 3% e 50%. Este resultado é compatível com efeito bactericida do óleo de girassol ozonizado, o que pode ser de interesse para terapia tópica empregada nos tratamentos de afecções superficiais de pele em cães.

**Palavras-chave:** Atividade antimicrobiana, óleo de girassol, ozônio, cães.

#### **Abstract**

Ozone is a gas whose properties have already been described, highlighting its disinfectant, bactericidal, fungicidal, viricidal action, capable of activating the enzymatic system and improving hematological and circulatory properties. When added to an oil vehicle, additional benefits can be gained in topical therapy of conditions. The present study aimed to evaluate the *in vitro* sensitivity of multidrug resistance (MDR) of *S. pseudintermedius* against ozonated sunflower oil. To verify the antimicrobial activity in

vitro, 48 clinical isolates of otitis and pyoderma from dogs were submitted to the microdilution plate technique to determine the minimum inhibitory concentration (MIC). Sunflower oil was subjected to the ozonolysis process for 12 hours, then it was diluted in concentrations from 100 to 1.5%. The samples submitted to the test with the oil were inhibited with MIC that varied between 3% and 50%. This result is compatible with the bactericidal effect of ozonated sunflower oil, which may be of interest for topical therapy used in the treatment of superficial skin disorders in dogs.

**Key words:** Antimicrobial activity, sunflower oil, ozone, dogs,

## Introdução

Os processos bacterianos que acometem orelha e pele (otite e piodermites superficiais) em cães são um problema recorrente e responsáveis por cerca de 20 a 75% dos atendimentos clínicos em medicina veterinária. Os principais agentes envolvidos nestes processos infecciosos são as bactérias do gênero *Staphylococcus* que têm apresentado uma elevada taxa de resistência aos antimicrobianos disponíveis para o tratamento de animais de companhia (Hill *et al.*, 2006; Marinho, 2020).

Os fatores de virulência como: produção de coagulase, presença de cápsula, produção de toxinas hemolíticas, enterotoxinas, lipases, proteases e a presença de proteína M na parede celular dos *Staphylococcus* spp. permitiram definir os membros do gênero entre espécies patogênicas e oportunistas e determinam o seu potencial para causar infecções (Mcvey *et al.*, 2016).

Em medicina veterinária podemos dar ênfase e classificar diferentes espécies do grupo dos estafilococos, a exemplo disto, temos o *S. pseudintermedius*, tido como principal agente em isolados oriundos de otites e piodermites superficiais em cães (Bond e Loeffler 2012; Bannhoer e Guardabassi, 2012).

A detecção de cepas do *S. pseudintermedius* resistentes a muitas classes de antimicrobianos já foi descrita, bem como seu potencial zoonótico e é consenso que a transmissão interespecies é fator determinante para o desenvolvimento de cepas multirresistentes (Kadlec e Schwarz, 2012; Weese e Van Duijkeren, 2011).

A necessidade de minimizar o uso ou até mesmo substituir o uso dos fármacos antimicrobianos é uma preocupação mundial, A ação antimicrobiana do óleo de girassol ozonizado possui um amplo espectro que inclui cepas bacterianas resistentes Gram- positivas e negativas (Sechi *et al.*, 2001).

Estudos com a finalidade de apontar compostos com capacidade antibacteriana têm sido objeto de grande interesse por parte dos cientistas. Considerando a importância clínica das piodermites e otites na casuística de atendimentos em clínicas de pequenos animais e o aumento da detecção da multirresistência do mais comum agente causador de distúrbios cutâneos, o objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade de isolados do *S. pseudintermedius* MDR frente a ação do óleo de girassol ozonizado.

## **Material e Métodos**

### **Amostras**

As bactérias utilizadas no estudo foram provenientes da coleção biológica, do Laboratório de Bacteriologia da FAMEZ/UFMS, cadastrada no SISGEN sob o número C 69392 e obtidas de processos clínicos infecciosos superficiais de pele e orelha em cães domésticos. Foram usadas 48 amostras de *S.pseudintermedius* MDR com perfil de resistência previamente caracterizado por meio da técnica de disco difusão conforme orientação do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Marinho, 2020) e classificados segundo a metodologia proposta por Schwarz *et al.*, 2010.

### **Reativação das amostras bacterianas**

As amostras bacterianas foram reativadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e o teste de pureza e viabilidade realizado em agar BHI e agar manitol salgado. Foram escolhidas algumas colônias bem isoladas que foram repicadas em caldo Mueller Hinton. A padronização do inóculo foi realizada pela equiparação da turvação do repique com o tubo 0,5 da escala de Mac Farland, que corresponde ao número de  $1,5 \times 10^8$  bactérias/mL. Esse inóculo foi usado para avaliar o potencial inibitório do óleo de girassol ozonizado.

### **Obtenção do óleo ozonizado**

O óleo ozonizado foi produzido no Laboratório de Pesquisa 2 do INQUI/UFMS, em Campo Grande, MS. Foi utilizado óleo de girassol industrializado prensado a frio, que foi submetido a aparelho gerador de ozônio modelo Ozonofil (JE90009 DISULFIL). Para ozonização foi usado um reator de coluna de bolhas com capacidade de 150 mL de fluido, que foi mantido no aparelho por 12 horas à temperatura de 22°C. Antes do uso nos testes de inibição bacteriana o óleo de girassol foi submetido à análise físico-química e determinado

os índices de: acidez (IA), iodo (II) e peróxido (IP) iniciais e após ozonólise. O armazenamento foi realizado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração.

### **Atividade antibacteriana do óleo de girassol ozonizado**

O ensaio de sensibilidade foi executado em placas de microtitulação de 96 poços. As concentrações do óleo de girassol ozonizado usadas foram: 100%, 75%, 50%, 25%, 12%, 6%, 3% e 1,5% o que corresponde a 212,6µg/ml, 159,45µg/ml, 106,30µg/ml, 53,15µg/ml, 26,57µg/ml, 13,28µg/ml, 6,64µg/ml, 3,32µg/ml, respectivamente.

As placas de titulação de 96 poços contendo inóculo, e as diferentes concentrações do óleo diluídas em caldo Mueller Hinton e Tween polisorbato 80 foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas. Após esta etapa, todos os poços foram semeados em placas de ágar BHI as quais foram incubadas a 37°C **overnight**. A leitura das placas foi realizada pela observação do crescimento de colônias. Foi considerada eficiente a menor concentração na qual não houve qualquer tipo de crescimento bacteriano.

Todos os ensaios foram realizados em duplicata, empregando como controles uma cepa *S. aureus* (ATCC 25923), um isolado clínico *S. pseudintermedius* não MDR, a viabilidade do inóculo, inóculo com gentamicina, esterilidade do Tween polisorbato 80 e do óleo de girassol ozonizado.

## **Resultados e Discussão**

### **Caracterização do óleo de girassol puro e ozonizado por 12 horas.**

O índice de acidez determinados para o óleo de girassol puro (OG-00) e ozonizado (OG-12) foram de  $0.80 \pm 0.26$  para  $8.39 \pm 0.25$ , ao comparar estes índices, conclui-se que o aumento é devido a formação dos compostos oxigenados durante a reação de ozonólise (Díaz *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2013).

Os índices de iodo (II) observados foram de  $123.58 \pm 1.02$  (SO.0) e  $62.61 \pm 0.68$  (OG-12) e a diminuição observada é consequência da reação do ozônio nas dupla ligações carbono-carbono, reduzindo o número de insaturações de ácidos graxos, uma vez que o (II) serve para quantificar as insaturações presentes (Shimamoto *et al.*, 2015). Esses valores estão de acordo com o que foi observado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da Fig. 6a, onde pode ser verificada a formação dos ozonídeos e a presença de insaturações.

Os índices de peróxido encontrados foram  $24.93 \text{ mEq Kg}^{-1} \pm 5.00$  para (OG-00) e  $3019.33 \text{ mEq Kg}^{-1} \pm 65.62$  para (OG-12). A formação dos compostos oxigenados, os

ozonídeos, faz com o IP aumente (Martínez- Sánchez *et al*, 2012) esta condição ocorre paralelamente à redução do (II) e foi observado neste estudo (Moureu et al., 2015).

Representado na Tab. 2 estão os valores obtidos nas análises para determinação do índice de acidez (IA), índice de iodo (II) e índice de peróxido (IP), no (OG-00) e (OG-12) e demonstram o aumento do IA, IP e redução do IO que é compatível com tempos de ozonização mais longos.

Tabela 2. Índice de acidez, iodo e peróxido no óleo de girassol puro e ozonizado

|       | IA (mg por KOH/g de óleo) | II (g de iodo/100g de óleo) | IP (mEq Kg <sup>-1</sup> ) |
|-------|---------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| OG-00 | 0.80 ± 0.26               | 123.58± 1.02                | 24.93 ± 5.00               |
| OG-12 | 8.39 ± 0.25               | 62.61 ± 0.68                | 3019.33± 65.62             |

#### Caracterização físico-química e espectroscópica por Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de <sup>1</sup>H e <sup>13</sup>C

No espectro de RMN de <sup>1</sup>H do óleo de girassol puro (OG-00), observamos sinais com deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios dos grupos que constituem as cadeias dos ácidos graxos dos triacilgliceróis: em 0,89 ppm, sinais dos hidrogênios do grupo metila terminal de cada cadeia de ácido graxo (-CH<sub>2</sub>- CH<sub>3</sub>); em 1,30 ppm, sinais atribuídos aos hidrogênios metilênicos (-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>- CH<sub>3</sub>); sinal em 1,61 ppm (multiplete), referente aos hidrogênios β- carbonila (COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-); 2,04 ppm (multiplete), que podem ser atribuídos aos hidrogênios alílicos (CH<sub>2</sub>-CH=CH-CH<sub>2</sub>-); em 2,31 ppm encontramos um tripleto compatível com hidrogênios α-carbonila (COO-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-) (Fig. 5a).

Ainda neste espectro, em 2,77 ppm podemos verificar a presença de um tripleto referente aos hidrogênios do grupo CH<sub>2</sub> entre as insaturações da cadeia do linoleato do triacilglicerol (-CH=CH-CH<sub>2</sub>-CH=CH-) (Fig. 4).

Os hidrogênios da posição 1 e 3 do glicerol se encontram em 4,30 e 4,15 ppm (duplo dublete) e em 5,27 ppm é possível observar um multiplete referente ao hidrogênio da posição 2 do glicerol (Fig. 4).

Na região de 5,32 – 5,39 observamos os sinais dos hidrogênios olefínicos (-CH=CH-) dos diferentes tipos de ésteres presentes na composição do óleo, destacando na Fig. 4 os dois ésteres que estão em maior proporção nos óleos de girassol (Díaz et al, 2012) (Fig. 5a).

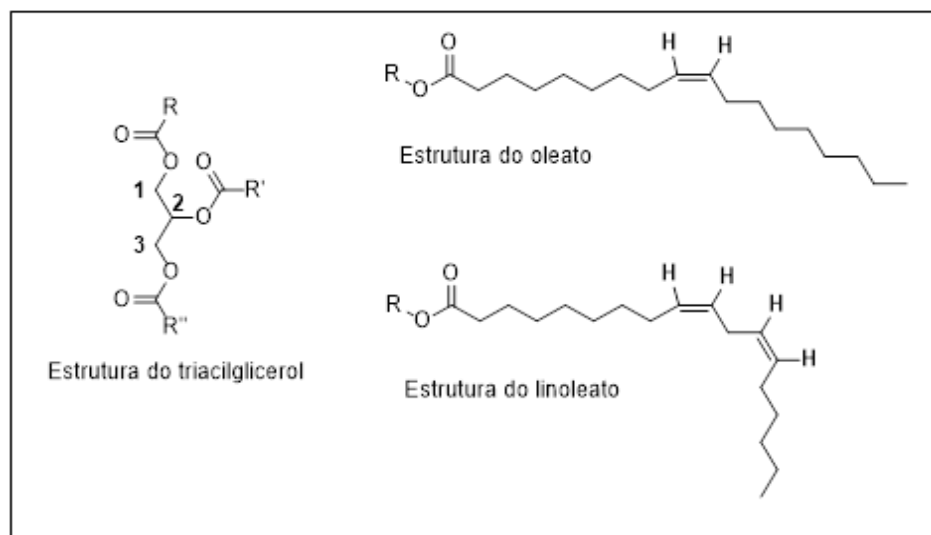


Figura 4 Representação dos fragmentos estruturais de triacilglicerol encontrados nos óleos vegetais

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , observamos 2 sinais em 173,2 e 172,8 ppm que podem ser atribuídos aos carbonos carbonílicos dos ésteres presentes no óleo.

Os carbonos  $\text{sp}^2$  são encontrados na região de 127,9 – 130, 2 ppm e os sinais em 62,1 e 68,8 ppm são dos carbonos da cadeia do glicerol.

Na região de 34,2 – 22,6 ppm são observados sinais referentes aos demais carbonos metilênicos presentes nas cadeias de ácidos graxos e, em 14,1 ppm, o sinal referente ao grupo metila (Fig. 5C).

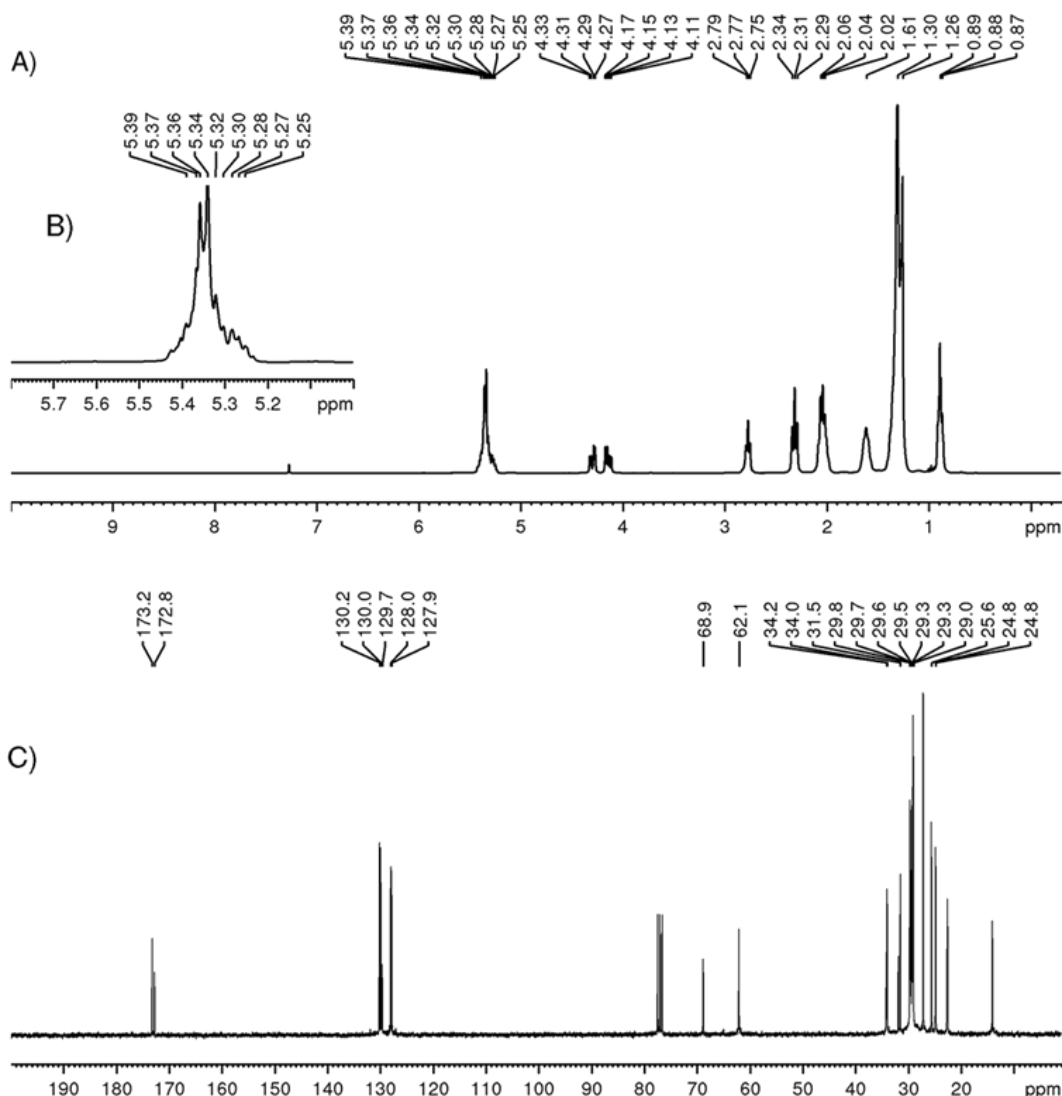


Figura 5 A) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de OG-00; B) Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da região de 5,8 – 5,0 ppm do OG-00; C) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de OG- 00.

No óleo ozonizado por 12 horas (OG-12) é possível observar a presença de novos sinais no espectro de  $^1\text{H}$  em 5,16 e 5,56 (multipletto), designados aos hidrogênios ligados aos carbonos dos ozonídeos formados (Fig. 6a, 6b). Novos sinais também são observados no espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  em 103,4 – 104,4 ppm, o que comprova a formação dos ozonídeos (Fig. 6c).

O multipletto em 5,56 ppm no espectro de RMN de  $^1\text{H}$  pode ser atribuído aos hidrogênios dos ozonídeos formados a partir da reação com o linoleato (cadeia com duas insaturações), levando à formação de dois ozonídeos.

Os sinais 5,32 – 5,39 referentes aos hidrogênios olefínicos ainda estão presentes, o indica que não houve reação completa do ozônio com as duplas ligações. Os demais sinais do espectro de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  encontram-se inalterados, indicando que a reação do ozônio ocorreu apenas nas insaturações.

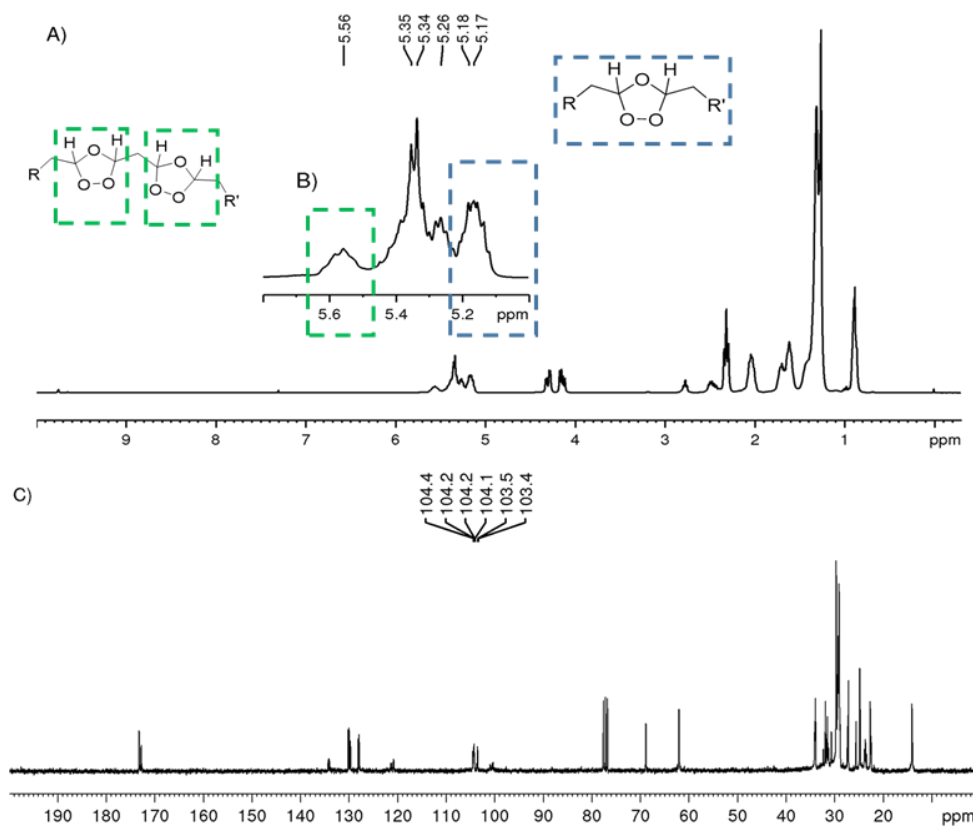


Figura 6A) Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de OG-12; B) Expansão do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da região de 5,8 – 5,0 ppm de OG-12; C) Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  de OG- 12.

### Testes de inibição pelo óleo de girassol ozonizado

Nos testes para determinar a concentração inibitória mínima para o óleo de girassol ozonizado por 12 horas (OG-12) frente a amostras de *S. pseudintermedius* MDR os valores apresentaram variação de  $\leq 3\%$  a  $\leq 50\%$ , com média de  $17,56 (\pm 13,69)$ .

A maior parte dos isolados 29 (60,41%) foram inibidos com concentrações abaixo do valor médio e o maior número (14- 29,17%) com  $\text{MIC} \leq 25$ . A menor concentração testada que corresponde a 1,5% não foi capaz de inibir o crescimento bacteriano. Os resultados da avaliação da concentração inibitória mínima estão apresentados na Tab. 3.

Tabela 3. Resultados da avaliação da concentração inibitória mínima para 48 isolados *S. pseudintermedius* MDR frente ao óleo de girassol ozonizado por 12 horas.

| MIC % | MIC $\mu\text{g/ml}$ | MIC $\text{mg/ml}$ | N. Isolados |
|-------|----------------------|--------------------|-------------|
| 100   | 212,6                | 0,213              | *           |
| 75    | 159,45               | 0,159              | *           |
| 50    | 106,30               | 0,106              | 5           |
| 25    | 53,15                | 0,53               | 14          |

|       |       |       |    |
|-------|-------|-------|----|
| 12,50 | 26,57 | 0,27  | 13 |
| 6     | 13,28 | 0,013 | 13 |
| 3     | 6,64  | 0,007 | 3  |
| 1,50  | 3,32  | 0,003 | -  |

Os resultados da CIM apresentados para *S. pseudintermedius* MDR são menores que os observados por Moureu et al., (2015), que para inibição de *S. aureus* utilizaram óleo ozonizado em 7 horas com adição de água ao processo e obtiveram CIM de 0.625 a 1.25mg/mL com IP 2680 mEq Kg<sup>-1</sup>. Os mesmos autores inferem que os valores de CIM (menores) são atingidos com aumento do IP, isto foi observado neste estudo com menores valores de MIC e maior valor do IP. Os autores relatam que as cepas estudadas frente ao óleo ozonizado sem água tinham valores de CIM de 5 mg/mL ou superior e que com a adição da água teve um efeito antibacteriano que foi melhorando com o tempo de ozonização. Portanto, a função tempo e as condições de ozonização são determinantes para o efeito significativo sobre a atividade antibacteriana.

Almeida et al., (2013) relatam inatividade do óleo de girassol ozonizado por 12 horas com IP 1761.87 mEq Kg<sup>-1</sup> frente *S. aureus* ATCC 25923, e neste estudo houve inibição das cepas controle com resultados expresso na Tab. 4.

Tabela 4. Resultados da avaliação da concentração inibitória mínima para cepas controle.

| Amostra                            | MIC % | MIC µg/ml | MIC mg/ml |
|------------------------------------|-------|-----------|-----------|
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923        | 3     | 6,64      | 0,007     |
| <i>S. pseudintermedius</i> não MDR | 3     | 6,64      | 0,007     |

Esta diferença pode estar relacionada aos níveis superiores de IP atingidos no presente estudo, bem como na técnica empregada para determinação da MIC que foi a microdiluição em caldo.

A ação antibacteriana de óleos ozonizados é relatada para bactérias Gram-positivas e Gram- negativas, Zanardi et al., (2013), avaliaram a viabilidade bacteriana relacionando tempo de ação, IP e duas concentrações diferentes de óleo ozonizado através da técnica de suspensão em caldo referindo maior sensibilidade para *S. aureus* mesmo em níveis inferiores de peróxido e em ação de 1 hora.

Segundo Curtiellas, (2014), a ação do óleo ozonizado em *S. aureus* e outras células bacterianas ocorre pela perda de íons K<sup>+</sup> intracelular induzindo reações do conteúdo citoplasmático que afetam a permeabilidade das células e o processo oxidativo causa danos irreversíveis a parede bacteriana. Portanto, para isolados de *S. pseudintermedius* MDR em virtude das semelhanças ao *S. aureus* podemos esperar o mesmo mecanismo de ação e a atividade bactericida evidenciada é relacionada ao nível de IP.

Para estudos *in vitro* frente a micro-organismos patogênicos, segundo Díaz et al., (2006) as diferenças na concentração de ácidos graxos contidos nos óleos vegetais não são relevantes na ação antibacteriana. Contudo, óleos mais ricos em ácidos graxos, quando ozonizados, formam mais compostos responsáveis pela atividade antimicrobiana, conclusão esta também relatada por Moureu et al., (2015).

Portanto, para comprovar a atividade biológica dos óleos ozonizados a determinação do índice de peróxido é a principal evidência e o tempo de ozonização influi diretamente neste índice. Mesmo que observada a ação bactericida *in vitro* do óleo de girassol ozonizado frente a *S. pseudintermedius* MDR, estudos que avaliem e determinem os níveis de toxicidade são relevantes antes da aplicação *in vivo* como terapia de uso tópico.

## Conclusão

O óleo de girassol ozonizado por 12 horas possui ação bactericida *in vitro* frente aos isolados de *S. pseudintermedius* MDR e estudos sobre a toxicidade são necessários antes da indicação do mesmo como alternativa tópica para tratamento de otites e piodermites superficiais.

## Referências

- ALMEIDA, Nathália R. *et al.* Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: a review. **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 4, n. 4, 18 jan. 2013.
- BANNOEHR, Jeanette; GUARDABASSI, Luca. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 253—e52, 19 abr. 2012.

- 1454 BOND, R.; LOEFFLER, A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic  
1455 revision and emergence of multi-drug resistance. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53,  
1456 n. 3, p. 147-154, 17 jan. 2012.
- 1457 CLSI. **Laboratory documents**: development and control; approved guideline. 5. ed. [S. l.]:  
1458 Clinical and Laboratory Standards Institute, 2006. 85 p. ISBN 9781562386009.
- 1459 CURTIELLAS, Vicente Piñol. Los aceites ozonizados en el tratamiento de enfermedades  
1460 infecciosas. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, v. 34, n. 2, p. 64-68, abr. 2014.
- 1461 DÍAZ, Maritza *et al.* Spectroscopic characterization of ozonides with biological activity.  
1462 **Ozone: Science & Engineering**, v. 23, n. 1, p. 35-40, jan. 2001.
- 1463 DÍAZ, Maritza F. *et al.* Study of ozonated sunflower oil using 1h NMR and microbiological  
1464 analysis. **Ozone: Science & Engineering**, v. 28, n. 1, p. 59-63, fev. 2006.
- 1465 HILL, P. B. *et al.* Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological  
1466 conditions in small animals in general practice. **Veterinary Record**, v. 158, n. 16, p. 533-  
1467 539, 22 abr. 2006.
- 1468 KADLEC, K. *et al.* Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus*  
1469 *pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North America.  
1470 **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1826-1828, 9 jun. 2010.
- 1471 MARINHO, Carolina Pereira. **Resistência a antibióticos em *Staphylococcus* spp. isolados**  
1472 **de cães com otite externa e piodermite superficial**. 2020. Dissertação de Mestrado —  
1473 Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2020.
- 1474 MARTÍNEZ SÁNCHEZ, G. Re L.; PÉREZ-DAVISON, G.; HORWAT DELAPORTE, R.  
1475 Las aplicaciones médicas de los aceites ozonizados, actualización. **Ozone Therapy Global**  
1476 **Journal**, v. 2, out. 2012.
- 1477 MCVEY, D. Scott; KENNEDY, Melissa; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia**  
1478 **veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 617 p.
- 1479 MOUREU, Sophie *et al.* Ozonation of sunflower oils: impact of experimental conditions on  
1480 the composition and the antibacterial activity of ozonized oils. **Chemistry and Physics of**  
1481 **Lipids**, v. 186, p. 79-85, fev. 2015.
- 1482 SECHI, L. A. *et al.* Antibacterial activity of ozonized sunflower oil (Oleozone). **Journal of**  
1483 **Applied Microbiology**, v. 90, n. 2, p. 279-284, 5 fev. 2001.
- 1484 SHIMAMOTO, Gustavo G.; FAVARO, Martha M. A.; TUBINO, Matthieu. Simple  
1485 methods via mid-ir or 1h NMR spectroscopy for the determination of the iodine value of  
1486 vegetable oils. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, 2015.

- 1487 WEESE, J. Scott; VAN DUIJKEREN, Engeline. Methicillin-resistant *Staphylococcus*  
1488 *aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary**  
1489 **Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 418-429, jan. 2010.
- 1490 ZANARDI, Iacopo *et al.* Physico-Chemical characterization of sesame oil derivatives.  
1491 **Lipids**, v. 43, n. 9, p. 877-886, 5 ago. 2008.
- 1492
- 1493

1494

**ANEXOS**

1495

**Determinação da MIC dos isolados**

1496

| <b>Leitura da MIC</b> |     |    |    |    |      |   |   |     |
|-----------------------|-----|----|----|----|------|---|---|-----|
| ↓→                    | 100 | 75 | 50 | 25 | 12,5 | 6 | 3 | 1,5 |
| 100                   | 0   | 1  | 1  | 1  | 1    | 1 | 1 | 1   |
| 75                    | 0   | 0  | 1  | 1  | 1    | 1 | 1 | 1   |
| 50                    | 0   | 0  | 0  | 1  | 1    | 1 | 1 | 1   |
| 25                    | 0   | 0  | 0  | 0  | 1    | 1 | 1 | 1   |
| 12,5                  | 0   | 0  | 0  | 0  | 0    | 1 | 1 | 1   |
| 6                     | 0   | 0  | 0  | 0  | 0    | 0 | 1 | 1   |
| 3                     | 0   | 0  | 0  | 0  | 0    | 0 | 0 | 1   |
| 1,5                   | 0   | 0  | 0  | 0  | 0    | 0 | 0 | 0   |

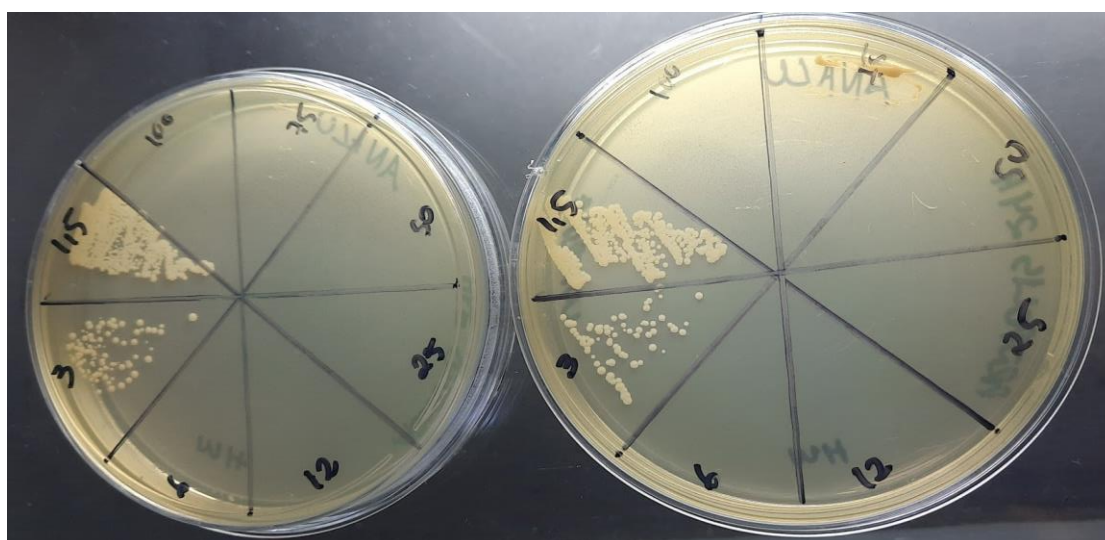
1497

1 = crescimento bacteriano

1498

0 = ausência de crescimento bacteriano

1499



1500

1501

1502

1503

1504

1505

Placa agar MH com colônias bacterianas presentes nas concentrações 1,5% e 3% indicando que a MIC para esta amostra é  $\leq 6\%$ , devido ausência crescimento bacteriano.

1506

**ANEXO - Normas Do Periódico Arquivos Brasileiro De Medicina Veterinária E Zootecnia**

1507

(Qualis A2)

1508

1509

1510

**Capítulos 1 e 2:** Formatados conforme as normas do periódico: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, disponível no link: <http://www.scielo.br/revistas/abmvz/iinstruc.h>



ISSN 1678-4162 versão online

## INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Política Editorial](#)
- [Reprodução de artigos publicados](#)
- [Orientações Gerais](#)
- [Comitê de Ética](#)
- [Tipos de artigos aceitos para publicação](#)
- [Preparação dos textos para publicação](#)
- [Formatação do texto](#)
- [Seções de um artigo](#)
- [Taxas de submissão e de publicação](#)
- [Recursos e diligências](#)

### Política Editorial

O periódico **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia** (Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science), ISSN 0102-0935 (impresso) e 1678-4162 (on-line), é editado pela FEPMVZ Editora, CNPJ: 16.629.388/0001-24, e destina-se à publicação de artigos científicos sobre temas de medicina veterinária, zootecnia, tecnologia e inspeção de produtos de origem animal, aquacultura e áreas afins.

Os artigos encaminhados para publicação são submetidos à aprovação do Corpo Editorial, com assessoria de especialistas da área (relatores). Os artigos cujos textos necessitarem de revisões ou correções serão devolvidos aos autores. Os aceitos para publicação tornam-se propriedade do **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia (ABMVZ)** citado como **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** Os autores são responsáveis pelos conceitos e informações neles contidos. São imprescindíveis originalidade, ineditismo e destinação exclusiva ao **ABMVZ**.

### Reprodução de artigos publicados

A reprodução de qualquer artigo publicado é permitida desde que seja corretamente referenciado. Não é permitido o uso comercial dos resultados.

A submissão e tramitação dos artigos é feita exclusivamente on-line, no endereço eletrônico <<http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo>>.

Não serão fornecidas separatas. Os artigos encontram-se disponíveis no endereço [www.scielo.br/abmvz](http://www.scielo.br/abmvz).

### Orientações Gerais

- Toda a tramitação dos artigos é feita exclusivamente pelo Sistema de publicação online do Scielo – ScholarOne, no endereço <http://mc04.manuscriptcentral.com/abmvz-scielo> sendo necessário o cadastramento no mesmo.
- Leia "[PASSO A PASSO – SISTEMA DE SUBMISSÃO DE ARTIGOS POR INTERMÉDIO DO SCHOLARONE](#)"
- Toda a comunicação entre os diversos autores do processo de avaliação e de publicação (autores, revisores e editores) será feita apenas de forma eletrônica pelo Sistema, sendo que o autor

responsável pelo artigo será informado automaticamente por e-mail sobre qualquer mudança de status do mesmo.

- Fotografias, desenhos e gravuras devem ser inseridos no texto e quando solicitados pela equipe de editoração também devem ser enviados, em separado, em arquivo com extensão JPG, em alta qualidade (mínimo 300dpi), zipado, inserido em "Figure or Image" (Step 6).
- É de exclusiva responsabilidade de quem submete o artigo certificar-se de que cada um dos autores tenha conhecimento e concorde com a inclusão de seu nome no texto submetido.
- O **ABMVZ** comunicará a cada um dos inscritos, por meio de correspondência eletrônica, a participação no artigo. Caso um dos produtores do texto não concorde em participar como autor, o artigo será considerado como desistência de um dos autores e sua tramitação encerrada.

### Comitê de Ética

É indispensável anexar cópia, em arquivo PDF, do Certificado de Aprovação do Projeto da pesquisa que originou o artigo, expedido pelo CEUA (Comitê de Ética no Uso de Animais) de sua Instituição, em atendimento à Lei 11794/2008. O documento deve ser anexado em "Ethics Committee" (Step 6). Esclarecemos que o número do Certificado de Aprovação do Projeto deve ser mencionado no campo Material e Métodos.

### Tipos de artigos aceitos para publicação

#### Artigo científico

É o relato completo de um trabalho experimental. Baseia-se na premissa de que os resultados são posteriores ao planejamento da pesquisa.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" – Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão (ou Resultados e Discussão), Conclusões, Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a 15, incluindo tabelas, figuras e Referências.

O número de Referências não deve exceder a 30.

#### Relato de caso

Contempla principalmente as áreas médicas em que o resultado é anterior ao interesse de sua divulgação ou a ocorrência dos resultados não é planejada.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6), Resumo, Abstract, Introdução, Casuística, Discussão e Conclusões (quando pertinentes), Agradecimentos (quando houver) e Referências.

O número de páginas não deve exceder a dez, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

### **Comunicação**

É o relato sucinto de resultados parciais de um trabalho experimental digno de publicação, embora insuficiente ou inconsistente para constituir um artigo científico.

Seções do texto: Título (português e inglês), Autores e Afiliação (somente na "Title Page" - Step 6). Deve ser compacto, sem distinção das seções do texto especificadas para "Artigo científico", embora seguindo àquela ordem. Quando a Comunicação for redigida em português deve conter um "Abstract" e quando redigida em inglês deve conter um "Resumo".

O número de páginas não deve exceder a oito, incluindo tabelas e figuras.

O número de Referências não deve exceder a 12.

### **Preparação dos textos para publicação**

Os artigos devem ser redigidos em português ou inglês, na forma impessoal.

### **Formatação do texto**

- O texto **NÃO** deve conter subitens em nenhuma das seções do artigo, deve ser apresentado em arquivo Microsoft Word e anexado como "Main Document" (Step 6), no formato A4, com margem de 3cm (superior, inferior, direita e esquerda), na fonte Times New Roman, no tamanho 12 e no espaçamento de entrelinhas 1,5, em todas as páginas e seções do artigo (do título às referências), **com linhas numeradas**.
- Não usar rodapé. Referências a empresas e produtos, por exemplo, devem vir, obrigatoriamente, entre parêntesis no corpo do texto na seguinte ordem: nome do produto, substância, empresa e país.

### **Seções de um artigo**

**Título:** Em português e em inglês. Deve contemplar a essência do artigo e não ultrapassar 50 palavras.

**Autores e Filiação:** Os nomes dos autores são colocados abaixo do título, com identificação da instituição a qual pertencem. O autor e o seu e-mail para correspondência devem ser indicados com asterisco somente no "Title Page" (Step 6), em arquivo Word.

**Resumo e Abstract:** Deve ser o mesmo apresentado no cadastro contendo até 200 palavras em um só parágrafo. Não repetir o título e não acrescentar revisão de literatura. Incluir os principais resultados numéricos, citando-os sem explicá-los, quando for o caso. Cada frase deve conter uma informação completa.

**Palavras-chave e Keywords:** No máximo cinco e no mínimo duas\*.  
 \* na submissão usar somente o Keyword (Step 2) e no corpo do artigo constar tanto keyword (inglês) quanto palavra-chave (português), independente do idioma em que o artigo for submetido.

**Introdução:** Explicação concisa na qual os problemas serão estabelecidos, bem como a pertinência, a relevância e os objetivos do trabalho. Deve conter poucas referências, o suficiente para balizá-la.

**Material e Métodos:** Citar o desenho experimental, o material envolvido, a descrição dos métodos usados ou referenciar corretamente os métodos já publicados. Nos trabalhos que envolvam animais e/ou organismos geneticamente modificados **deverão constar obrigatoriamente o número do Certificado de Aprovação do CEUA**. (verificar o Item Comitê de Ética).

**Resultados:** Apresentar clara e objetivamente os resultados encontrados.

*Tabela.* Conjunto de dados alfanuméricos ordenados em linhas e colunas. Usar linhas horizontais na separação dos cabeçalhos e no final da tabela. O título da tabela recebe inicialmente a palavra Tabela, seguida pelo número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Tabela 1.). No texto, a tabela deve ser referida como Tab seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Tab. 1), mesmo quando referir-se a várias tabelas (ex.: Tab. 1, 2 e 3). Pode ser apresentada em espaçamento simples e fonte de tamanho menor que 12 (o menor tamanho aceito é oito). A legenda da Tabela deve conter apenas o indispensável para o seu entendimento. As tabelas devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

*Figura.* Compreende qualquer ilustração que apresente linhas e pontos: desenho, fotografia, gráfico, fluxograma, esquema etc. A legenda recebe inicialmente a palavra Figura, seguida do número de ordem em algarismo arábico e ponto (ex.: Figura 1.) e é citada no texto como Fig seguida de ponto e do número de ordem (ex.: Fig.1), mesmo se citar mais de uma figura (ex.: Fig. 1, 2 e 3). Além de inseridas no corpo do texto, fotografias e desenhos devem também ser enviados no formato JPG com alta qualidade, em um arquivo zipado, anexado no campo próprio de submissão, na tela de registro do artigo. As figuras devem ser obrigatoriamente inseridas no corpo do texto de preferência após a sua primeira citação.

**Nota:** Toda tabela e/ou figura que já tenha sido publicada deve conter, abaixo da legenda, informação sobre a fonte (autor, autorização de uso, data) e a correspondente referência deve figurar nas Referências.

**Discussão:** Discutir somente os resultados obtidos no trabalho. (Obs.: As seções Resultados e Discussão poderão ser apresentadas em conjunto a juízo do autor, sem prejudicar qualquer uma das partes).

**Conclusões:** As conclusões devem apoiar-se nos resultados da pesquisa executada e serem apresentadas de forma objetiva, **SEM** revisão de literatura, discussão, repetição de resultados e especulações.

**Agradecimentos:** Não obrigatório. Devem ser concisamente expressados.

**Referências:** As referências devem ser relacionadas em ordem alfabética, dando-se preferência a artigos publicados em revistas nacionais e internacionais, indexadas. Livros e teses devem ser

referenciados o mínimo possível, portanto, somente quando indispensáveis. São adotadas as normas gerais da ABNT, **adaptadas** para o ABMVZ, conforme exemplos:

#### Como referenciar:

##### 1. Citações no texto

A indicação da fonte entre parênteses sucede à citação para evitar interrupção na sequência do texto, conforme exemplos:

- autoria única: (Silva, 1971) ou Silva (1971); (Anuário..., 1987/88) ou Anuário... (1987/88);
- dois autores: (Lopes e Moreno, 1974) ou Lopes e Moreno (1974);
- mais de dois autores: (Ferguson *et al.*, 1979) ou Ferguson *et al.* (1979);
- mais de um artigo citado: Dunne (1967); Silva (1971); Ferguson *et al.* (1979) ou (Dunne, 1967; Silva, 1971; Ferguson *et al.*, 1979), sempre em ordem cronológica ascendente e alfabética de autores para artigos do mesmo ano.

**Citação de citação.** Todo esforço deve ser empreendido para se consultar o documento original. Em situações excepcionais pode-se reproduzir a informação já citada por outros autores. No texto, citar o sobrenome do autor do documento não consultado com o ano de publicação, seguido da expressão **citado por** e o sobrenome do autor e ano do documento consultado. Nas Referências deve-se incluir apenas a fonte consultada.

**Comunicação pessoal.** Não faz parte das Referências. Na citação coloca-se o sobrenome do autor, a data da comunicação, nome da Instituição à qual o autor é vinculado.

**2. Periódicos** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

ANUÁRIO ESTATÍSTICO DO BRASIL. v.48, p.351, 1987-88.

FERGUSON, J.A.; REEVES, W.C.; HARDY, J.L. Studies on immunity to alphaviruses in foals. *Am. J. Vet. Res.*, v.40, p.5-10, 1979.

HOLENWEGER, J.A.; TAGLE, R.; WASERMAN, A. et al. Anestesia general del canino. *Not. Med. Vet.*, n.1, p.13-20, 1984.

**3. Publicação avulsa** (até quatro autores citar todos. Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo. México: UTEHA, 1967. 981p.

LOPES, C.A.M.; MORENO, G. Aspectos bacteriológicos de ostras, mariscos e mexilhões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 14., 1974, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 1974. p.97. (Resumo).

MORRIL, C.C. Infecciones por clostrídios. In: DUNNE, H.W. (Ed). Enfermedades del cerdo.

México: UTEHA, 1967. p.400-415.

NUTRIENT requirements of swine. 6.ed.  
Washington: National Academy of Sciences, 1968.  
69p.

SOUZA, C.F.A. *Produtividade, qualidade e rendimentos de carcaça e de carne em bovinos de corte*. 1999. 44f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Escola de Veterinária, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

**4. Documentos eletrônicos** (até quatro autores citar todos.  
Acima de quatro autores citar três autores *et al.*):

QUALITY food from animals for a global market.  
Washington: Association of American Veterinary Medical College, 1995. Disponível em:  
<<http://www.org/critca16.htm>>. Acessado em:  
27 abr. 2000.

JONHNSON, T. Indigenous people are now more combative, organized. Miami Herald, 1994.  
Disponível em:  
<<http://www.summit.fiu.edu/MiamiHerd-Summit-RelatedArticles/>>. Acessado em: 5 dez. 1994.

1517

**Recursos e diligências**

- No caso de o autor encaminhar resposta às diligências solicitadas pelo ABMVZ ou documento de recurso o mesmo deverá ser anexado em arquivo Word, no item "Justification" (Step 6), e também enviado por e-mail, aos cuidados do Comitê Editorial, para [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).
- No caso de artigo não aceito, se o autor julgar pertinente encaminhar recurso o mesmo deve ser feito pelo e-mail [abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br).

[[Home](#)] [[Sobre esta revista](#)] [[Corpo editorial](#)] [[Assinaturas](#)]



Todo o conteúdo do periódico, exceto onde está identificado, está licenciado sob uma [Licença Creative Commons](#)

© 2001-2007 Escola de Veterinária UFMG

Caixa Postal 567  
30123-970 Belo Horizonte MG Brasil  
Tel: +55 31 3409-2042  
Tel: +55 31 3409-2041



[abmvz.artigo@abmvz.org.br](mailto:abmvz.artigo@abmvz.org.br)

1518

1519

1520

1521

1522

## ANEXOS

Perfil de resistência e sensibilidade das 48 amostras de *S. Pseudintermedius* oriundas de orelha e pele de cães.

| ID. Nº | GEN | AMC | CFV | CFE | AZT | POL | ENR | NOR | SUT | DOX | R/ Classes ATB |
|--------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|----------------|
| 1      | S   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 6              |
| 2      | S   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | 5              |
| 3      | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | 3              |
| 4      | R   | S   | R   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | 5              |
| 5      | R   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 5              |
| 6      | R   | S   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 6              |
| 7      | S   | R   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 5              |
| 8      | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | 4              |
| 9      | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | 4              |
| 10     | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 6              |
| 11     | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | 3              |
| 12     | R   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 5              |
| 13     | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | 3              |
| 14     | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | 4              |
| 15     | R   | R   | R   | R   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | 5              |
| 16     | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | R   | R   | 3              |
| 17     | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | 4              |
| 18     | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 7              |
| 19     | R   | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | 7              |
| 20     | S   | S   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | S   | R   | 5              |
| 21     | R   | S   | R   | R   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | 5              |
| 22     | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 4              |
| 23     | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | 3              |
| 24     | R   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | 3              |
| 25     | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | S   | R   | 3              |
| 26     | R   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 6              |
| 27     | R   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 5              |
| 28     | S   | S   | R   | R   | R   | R   | S   | S   | R   | R   | 5              |
| 29     | R   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | 3              |
| 30     | R   | R   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | 5              |
| 31     | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 4              |
| 32     | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | 3              |
| 33     | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 4              |
| 34     | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | 3              |
| 35     | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 6              |
| 36     | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | 3              |
| 37     | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 6              |
| 38     | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | 4              |
| 39     | R   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | 7              |
| 40     | R   | S   | S   | R   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | 3              |
| 41     | S   | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | R   | R   | 3              |
| 42     | S   | S   | S   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | R   | 3              |
| 43     | S   | R   | R   | R   | R   | R   | R   | S   | R   | S   | 5              |
| 44     | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | R   | R   | 4              |
| 45     | S   | S   | S   | S   | R   | R   | S   | S   | S   | R   | 3              |
| 46     | S   | R   | S   | S   | R   | R   | R   | S   | R   | R   | 6              |
| 47     | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | R   | 4              |
| 48     | S   | S   | S   | R   | S   | S   | S   | R   | R   | R   | 4              |

## ANEXO

Resultados dos testes controle, determinação das concentrações inibitórias mínimas do extrato alcoólico da própolis marrom/Terenos – MS e óleo de girassol ozonizado por 12 horas nas 48 amostras de *S. Pseudintermedius* oriundas de orelha e pele de cães.

| ID. Nº | Coagulase | Inóculo  | Própolis | Óleo Oz. | Tween 80 | Álcool   | Inóculo+ Genta. | MIC Prop. 1 hora | MIC Prop. 24 horas | MIC OG12 24h |
|--------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------|------------------|--------------------|--------------|
| 1      | N         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤25                | ≤12          |
| 2      | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤50              | ≤25                | ≤6           |
| 3      | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤12              | ≤6                 | ≤25          |
| 4      | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo        | ≤50              | ≤50                | ≤25          |
| 5      | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤50              | ≤25                | ≤12          |
| 6      | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤6                 | ≤12          |
| 7      | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo        | ≤12              | ≤12                | ≤3           |
| 8      | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤25                | ≤3           |
| 9      | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤25                | ≤6           |
| 10     | N         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤25                | ≤6           |
| 11     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤50              | ≤50                | ≤6           |
| 12     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo        | ≤25              | ≤25                | ≤25          |
| 13     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤25                | ≤3           |
| 14     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤25                | ≤12          |
| 15     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤50              | ≤25                | ≤25          |
| 16     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo        | ≤25              | ≤12                | ≤6           |
| 17     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤50              | ≤25                | ≤12          |
| 18     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo        | ≤50              | ≤50                | ≤6           |
| 19     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo        | ≤75              | ≤25                | ≤6           |
| 20     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo        | ≤50              | ≤25                | ≤6           |
| 21     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤50              | ≤50                | ≤12          |
| 22     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤6                 | ≤6           |
| 23     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤12                | ≤25          |
| 24     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤12                | ≤6           |
| 25     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤6                 | ≤25          |
| 26     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤12                | ≤12          |
| 27     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo        | ≤25              | ≤25                | ≤12          |
| 28     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤12                | ≤6           |
| 29     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo        | ≤25              | ≤12                | ≤12          |
| 30     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤12              | ≤3                 | ≤12          |
| 31     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤12                | ≤12          |
| 32     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤12                | ≤12          |
| 33     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤12                | ≤25          |
| 34     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤3                 | ≤12          |
| 35     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤50              | ≤50                | ≤25          |
| 36     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤12              | ≤1,5               | ≤25          |
| 37     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤1,5               | ≤25          |
| 38     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤12              | ≤1,5               | ≤6           |
| 39     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤12              | ≤1,5               | ≤25          |
| 40     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤6                 | ≤25          |
| 41     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤1,5               | ≤6           |
| 42     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤12                | ≤50          |
| 43     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤25                | ≤50          |
| 44     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤6                 | ≤50          |
| 45     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤50              | ≤25                | ≤25          |
| 46     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤12                | ≤25          |
| 47     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25              | ≤25                | ≤50          |
| 48     | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | positivo        | ≤25              | ≤25                | ≤50          |

## ANEXO

Perfil de resistência e sensibilidade da amostra de *S. Pseudintermedius* não MDR e *S. aureus* ATCC 25923.

| ID. Nº                             | GEN | AMC | CFV | CFE | AZT | POL | ENR | NOR | SUT | DOX | R/ Classes ATB. |
|------------------------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----------------|
| <i>S. Pseudintermedius</i> não MDR | S   | S   | S   | S   | S   | R   | S   | R   | S   | R   | 3               |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923        | S   | S   | R   | S   | R   | R   | R   | S   | S   | S   | 4               |

Resultados testes controle e determinação das concentrações inibitórias mínimas do extrato alcoólico da própolis marrom/Terenos – MS e óleo de girassol ozonizado por 12 horas na amostra *S. Pseudintermedius* não MDR e *S. aureus* ATCC 25923.

| ID. Nº                             | Coagulase | Inóculo  | Própolis | Óleo Oz. | Tween 80 | Álcool   | Inóculo+ Genta. | MIC Prop. 1hora | MIC Prop. 24horas | MIC OG12 24h |
|------------------------------------|-----------|----------|----------|----------|----------|----------|-----------------|-----------------|-------------------|--------------|
| <i>S. pseudintermedius</i> não MDR | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25             | ≤12               | ≤3           |
| <i>S. aureus</i> ATCC 25923        | P         | positivo | negativo | negativo | negativo | negativo | negativo        | ≤25             | ≤6                | ≤3           |