



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 PIDERMITE 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:

EXAMINADOR	AVALIAÇÃO
Dra. Cassia Rejane Brito Leal (Presidente) _____	(APROVADO)
Dr. Andrei Kelliton Fabretti (Externo) _____	(APROVADO)
Dr. Antonio Francisco de Souza Filho (Externo) _____	(APROVADO)

RESULTADO FINAL:

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, 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 *S. pseudintermedius* a sete classes de antimicrobianos.32
- Figura 2. Resultado da avaliação de sensibilidade aos compostos antimicrobianos e suas classes para amostras de *Staphylococcus pseudintermedius*.34
- Figura 3. (a) Distribuição dos valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) em 48 isolados *S. pseudintermedius* 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 vegetais49
- Figura 5 A) Espectro de RMN de 1H de OG-00; B) Expansão do espectro de RMN de 1H da região de 5,8 – 5,0 ppm do OG-00; C) Espectro de RMN de ^{13}C de OG-00.....50
- Figura 6A) Espectro de RMN de 1H de OG-12; B) Expansão do espectro de RMN de 1H da região de 5,8 – 5,0 ppm de OG-12; C) Espectro de RMN de ^{13}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.

7 8 9 **RESUMO**

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

35

36 Among the problems that affect companion animals, dermatoses of bacterial origin
37 have a high incidence in the routine of clinical treatment in Veterinary Medicine. Due
38 to the growing phenomenon of resistance of microorganisms to antimicrobials, the
39 few conventional therapeutic options for the treatment of dogs and cats and aiming
40 to reduce the harmful effects of these skin disorders, the search for therapies with
41 compounds of natural origin has been shown an alternative. The objective of this
42 work was to evaluate the in vitro inhibitory action of the alcoholic extract of brown
43 propolis (30%) and ozonated sunflower oil against multidrug-resistant
44 *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical cases of dermatitis and
45 otitis in dogs. The compounds were tested on 48 bacterial isolates, using the broth
46 microdilution technique. Dilutions of compounds ranging from 1.5% to 100%
47 concentration were used. To verify the in vitro antimicrobial activity of propolis, 48
48 isolates were exposed to two action times of 1 hour and 24 hours and tested to
49 determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC). The propolis with action in
50 1 hour presented the variation of the inhibitory concentration between 12.5% and
51 75% and with action in 24 hours between 1.5% and 50%. The bactericidal effect
52 occurred in both times. For ozonated oil, the MIC ranged between 3% and 50%. It
53 is concluded that both compounds have an inhibitory action on multidrug-resistant
54 *S. pseudintermedius* isolates, which may constitute a future alternative for the
55 treatment of superficial skin infections.

56

57

CAPÍTULO 1

58 1. INTRODUÇÃO

59

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

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

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

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

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

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

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

97 **2. OBJETIVOS**

98

99 **2.1 Objetivo geral**

100

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

104 **2.2 Objetivos específicos**

105

106 • Caracterizar fenotipicamente, pela técnica de disco-difusão, isolados
107 multirresistentes de *S. pseudintermedius* provenientes de processos clínicos de
108 dermatite e otite canina;

109 • Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do extrato alcóolico de
110 própolis marrom a 30%, produzida no município de Terenos, MS, sobre isolados *S.*
111 *pseudintermedius*, em dois diferentes tempos de exposição;

112 • Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de girassol
113 ozonizado por 12 horas, sobre isolados de *S. pseudintermedius*.

114

115 3 REVISÃO DE LITERATURA

116

117 3.1 O gênero *Staphylococcus*

118

119 O gênero *Staphylococcus* é constituído por cocos Gram-positivos que se
120 assemelham a cachos de uvas e por vezes podem ser visualizados em forma de
121 células isoladas, em pares, tétrades e cadeias curtas. Os membros desta espécie
122 são em sua maioria aeróbicos facultativos, catalase positiva e não apresentam
123 motilidade e nem esporulação (WINN, JR. et al., 2010). Crescem bem em meios de
124 cultura básicos, são halófilos moderados e algumas espécies podem fermentar
125 manitol e produzir hemolisinas, além de outras exotoxinas. Suas diferenças
126 genotípicas e processos patogênicos permitem a classificação em 84 espécies e
127 30 subespécies conhecidas atualmente (BOND; LOEFFLER, 2012; PARTE *et al.*,
128 2020).

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

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

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

145

146 3.2A espécie *Staphylococcus pseudintermedius*

147

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

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

161 O status taxonômico permaneceu inquestionável até a descrição do
162 *Staphylococcus pseudintermedius* por Devriese et al. (2005), denominado desta
163 forma pela semelhança fenotípica ao *S. intermedius*. A partir daí foi adotada uma
164 classificação taxonômica com a diferenciação de mais três espécies bacterianas,
165 *S. intermedius*, *S. delphini* e *S. pseudintermedius* que juntos foram denominados
166 SIG (*Staphylococcus intermedius group*). Cada uma delas foi associada a
167 processos infecciosos de espécies animais diferentes, *S. delphini* a infecções
168 cutâneas purulentas de golfinhos, *S. intermedius* em isolados de pombos e *S.*
169 *pseudintermedius* como agente etiológico de piodermites em cães (SASAKI et al.,
170 2007; DEVRIESE et al., 2009).

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

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

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

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

192

193 **3.3 Emergência da resistência aos antimicrobianos**

194

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

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

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

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

216 o gene *mecA*. A hipótese dessa ocorrência é que por meio do contato estreito e
217 frequente do homem e seus animais de estimação houve a troca das informações
218 genéticas entre as cepas. Hoje a identificação de MRSP em amostras clínicas de
219 animais já está consolidada e estudos têm evidenciado o aumento da resistência
220 também para outras classes de antimicrobianos como: fluoroquinolonas,
221 macrolídeos, aminoglicosídeos e tetraciclina (SASAKI et al., 2007; KADLEC et al.,
222 2010; VAN DUIJKEREN et al., 2011).

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

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

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

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

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

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

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

256

257 **3.4 Própolis**

258

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

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

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

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

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

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

297 Administrada sob diversas formas, o uso da própolis é seguro e menos tóxico
298 que muitos medicamentos sintéticos. É um dos diversos produtos naturais
299 utilizados durante séculos pela humanidade, havendo registros entre os assírios,
300 gregos, romanos, incas e egípcios. De acordo com a literatura consultada, data de
301 1700 A.C (Egito antigo e Mesopotâmia) os dados históricos da utilização da própolis
302 pelo homem, na época conhecida como “cera negra” e muito empregada no
303 processo de embalsamação dos mortos (MAZZUCO, 1996; CASTALDO;
304 CAPASSO, 2002;; PEREIRA; SEIXAS; AQUINO NETO, 2002).

305 No que diz respeito às propriedades biológicas, a própolis tem ações
306 antimicrobianas, antioxidantes, anti-inflamatórias, imunomodulatórias,
307 hipotensivas, cicatrizantes, anestésicas, anticânceres, anti-HIV e anticariogênicas.
308 Suas propriedades obviamente estão ligadas a composição química, neste
309 contexto, por apresentar uma composição heterogênea de substâncias ativas, vem
310 sendo estudada e representa uma importante matéria prima para muitos produtos
311 de saúde, constituindo uma vasta e interdisciplinar área de pesquisa (PARK et al.,
312 2002; SILVA et al., 2007).

313

314 **3.5 Potencial Antimicrobiano da própolis**

315

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

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

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

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

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

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

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

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

362

363 **3.6 Óleo De Girassol Ozonizado**

364

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

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

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

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

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

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

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

412 O IA representa a quantidade de ácidos graxos livres na amostra e o índice de
413 iodo (II) é uma técnica que permite quantificar as insaturações presentes no óleo.
414 Essa técnica mede a quantidade de I₂ consumido em 100g de amostra e depende
415 de vários fatores, como a quantidade de duplas ligações carbono-carbono,
416 condições de armazenamento e processos de oxidação (ALMEIDA et al., 2013).
417 Como o ozônio reage nas duplas ligações formando os ozonídeos, o número de

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

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

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

429

430 **3.7A aplicabilidade do óleo de girassol ozonizado**

431

432 A diversidade de uso do óleo de girassol está vinculada a sua composição que
433 possui uma alta concentração de ácido linoleico (48-74%), seguida por ácido oleico
434 (14-39%) e uma menor quantidade de ácido linolênico e outros ácidos graxos
435 presentes em sua estrutura. Quando vislumbramos tratar o epitélio, o ácido linoleico
436 (ω -6 ou n-6) e o ácido linolênico (ω 3 ou n-3) são os mais importantes (MOREIRA;
437 CURI, MANCINI FILHO, 2002; ZANARDI et al., 2008; FERREIRA et al., 2012).

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

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

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

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

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

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

472

473

474

475

476

477

478

479

480

481

482

483

484 **4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

485

486 ALMEIDA, Nathália R. *et al.* Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: a
487 review. **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 4, n. 4, 18 jan. 2013.

488 ALVAREZ, Carlos.; LABARCA, Jaime.; SALLES, Mauro. Prevention strategies for
489 methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) in Latin America. **Brazilian**
490 **Journal of Infectious Diseases**, v. 14, p. 107-108, dez. 2010.

491 ANDREOTTI, R.; NICODEMO, M. L. F. **Uso de antimicrobianos na produção de**
492 **bovinos e desenvolvimento da resistência.** - Portal Embrapa. Disponível
493 em: <[https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/320735/uso-de-](https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/320735/uso-de-antimicrobianos-na-producao-de-bovinos-e-desenvolvimento-da-resistencia)
494 [antimicrobianos-na-producao-de-bovinos-e-desenvolvimento-da-resistencia](https://www.embrapa.br/busca-de-publicacoes/-/publicacao/320735/uso-de-antimicrobianos-na-producao-de-bovinos-e-desenvolvimento-da-resistencia)>.

495 Acesso em: 25 maio 2022.

496 ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **IN N° 87**, de 15 de
497 março de 2021 - DOU - Imprensa Nacional. Disponível em:
498 <[https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-87-de-15-de-marco-](https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-87-de-15-de-marco-de-2021-309008143)
499 [de-2021-309008143](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.

500 ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **IN N° 481**, de 15 de
501 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
502 [resolucao-rdc-n-481-de-15-de-marco-de-2021-309012789](https://www.in.gov.br/web/dou/-/resolucao-rdc-n-481-de-15-de-marco-de-2021-309012789)>. Acesso em: 02 de
503 Maio 2022.

504 BANKOVA, Vassya S.; CASTRO, Solange L. de.; MARCUCCI, Maria C. Propolis:
505 recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**, v. 31, n. 1, p. 3-15, jan.
506 2000.

507 BANNOEHR, Jeanette; GUARDABASSI, Luca. *Staphylococcus pseudintermedius*
508 in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and
509 pathogenicity. **Veterinary Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 253—e52, 19 abr. 2012

510 BOND, R.; LOEFFLER, A. What's happened to *Staphylococcus intermedius*?
511 Taxonomic revision and emergence of multi-drug resistance. **Journal of Small**
512 **Animal Practice**, v. 53, n. 3, p. 147-154, 17 jan. 2012.

513 CARDOSO, Irlaine da Conceição Costa *et al.* Potencial antimicrobiano de óleos
514 vegetais ozonizados frente a espécies bacterianas: uma revisão
515 integrativa. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 2, p. e22410212451,
516 13 fev. 2021

517 CASTALDO, Stefano.; CAPASSO, Francesco. Propolis, an old remedy used in
518 modern medicine. **Fitoterapia**, v. 73, p. S1—S6, nov. 2002.

519 CHEN, Chia-Nan *et al.* Cytotoxic prenylflavanones from taiwanese
520 propolis. **Journal of Natural Products**, v. 66, n. 4, p. 503-506, abr. 2003

521 CODNER, E. C.; RHODES, K. H. Pioderma In: TILLEY, L.P.; SMITH, F.W.K.JR.
522 **Consulta veterinária em 5 minutos - Espécies canina e felina.** 2ª. ed. São Paulo.
523 v. 2. p.1136- 1137, 2003.

524 CONCEIÇÃO, L. G.; FABRIS, V. E. Piodermite Canina: etiopatogênese, diagnóstico
525 e terapia antimicrobiana sistêmica. **Revista Cães e Gatos**, v. 86, ano 14, p. 21 – 28.
526 2000.

527 CORREIA SILVA, Iara Michelle *et al.* Avaliação das potencialidades e
528 características físico-químicas do óleo de Girassol (*Helianthus annuus* L.) e Coco
529 (*Cocos nucifera* L.) produzidos no Nordeste brasileiro. **Scientia Plena**, v. 10, n. 3,
530 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 using¹H 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.

- 580 HILL, P. B. *et al.* Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of
581 dermatological conditions in small animals in general practice. **Veterinary Record**,
582 v. 158, n. 16, p. 533-539, 22 abr. 2006.
- 583 HUERTA, Belén *et al.* Risk factors associated with the antimicrobial resistance of
584 *staphylococci* in canine pyoderma. **Veterinary Microbiology**, v. 150, n. 3-4, p. 302-
585 308, jun. 2011.
- 586 KADLEC, K. *et al.* Molecular analysis of methicillin-resistant *Staphylococcus*
587 *pseudintermedius* of feline origin from different European countries and North
588 America. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 8, p. 1826-1828,
589 9 jun. 2010.
- 590 KHAN, Sardar Ali *et al.* Ozone therapy for diabetic foot. **Medical Gas Research**,
591 v. 8, n. 3, p. 111, 2018.
- 592 LIMA, Máira Ferreira Pinto *et al.* *Staphylococcus aureus* e as infecções hospitalares
593 – Revisão de literatura. **Uningá Review**, v. 21, n. 1, 2015.
- 594 LIMA, Manoel; FELIX, Erika; CARDOSO, Arnaldo. Aplicações e implicações do
595 ozônio na indústria, ambiente e saúde. **Química Nova**, 2021.
- 596 LU, Li-Chang; CHEN, Yue-Wen; CHOU, Cheng-Chun. Antibacterial activity of
597 propolis against *Staphylococcus aureus*. **International Journal of Food**
598 **Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 213-220, jul. 2005.
- 599 MAGALHÃES, Thaís Vendramini; LOT, Rômulo Francis Estangari; DEL
600 CARRATORE, Carlos Rossi. Análise da ação antibacteriana da própolis e
601 padronização de volumes através de antibiograma. **Revista Unimar Ciências**,
602 v. 25, n. 1-2, 2016.
- 603 MANDERS, Steven M. Toxin-mediated streptococcal and staphylococcal
604 disease. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 39, n. 3, p. 383-
605 398, set. 1998.
- 606 MARINHO, Carolina Pereira. **Resistência a antibióticos em *Staphylococcus***
607 **spp. isolados de cães com otite externa e piodermite superficial**. 2020.
608 Dissertação de Mestrado — Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo
609 Grande, 2020.
- 610 MARTINS, Andiara *et al.* Efeito bactericida do gerador de alta frequência na cultura
611 de *Staphylococcus aureus*. **Fisioterapia e Pesquisa**, v. 19, n. 2, p. 153-157, jun.
612 2012.
- 613 MAZZUCO, H. *et al.* Utilização da própolis e álcool etílico no controle de *Salmonella*
614 em rações avícolas. **Scientia Agricola**, v. 53, n. 1, jan. 1996.
- 615 MCVEY, D. Scott; KENNEDY, Melissa; CHENGAPPA, M. M. **Microbiologia**
616 **veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016. 617 p.
- 617 MOREIRA, Nara Xavier; CURI, Rui; MANCINI FILHO, Jorge. Ácidos graxos: uma
618 revisão. **J. Brazilian Soc. Food Nutr**, v. 24, p. 105-123, dez. 2002.
- 619 MOUREU, Sophie *et al.* Ozonation of sunflower oils: impact of experimental
620 conditions on the composition and the antibacterial activity of ozonized
621 oils. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 186, p. 79-85, fev. 2015.
- 622 PARK, Yong Kun *et al.* Própolis produzida no sul do Brasil, Argentina e Uruguai:
623 evidências fitoquímicas de sua origem vegetal. **Ciência Rural**, v. 32, n. 6, p. 997-
624 1003, dez. 2002.
- 625 PARTE, Aidan C. *et al.* List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature
626 (LPSN) moves to the DSMZ. **International Journal of Systematic and**
627 **Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 11, p. 5607-5612, 1 nov. 2020. Disponível
628 em: <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004332>. Acesso em: 7 jun. 2022.

- 629 PEREIRA, Alberto dos Santos; SEIXAS, Fernando Rodrigues Mathias Silva;
630 AQUINO NETO, Francisco Radler de. Própolis: 100 anos de pesquisa e suas
631 perspectivas futuras. **Química Nova**, v. 25, n. 2, p. 321-326, maio 2002.
- 632 PERRETEN, V. *et al.* Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus*
633 *pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre
634 study. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 65, n. 6, p. 1145-1154, 25 mar.
635 2010.
- 636 PITCHENIN, Leticia Camara. **Ocorrência de genes de citotoxinas, toxinas**
637 **esfoliativas e pirogênicas em isolados de *Staphylococcus pseudintermedius***
638 **de espécies domésticas e silvestres**. 2016. Dissertação de mestrado -
639 Universidade Federal de Mato Grosso, [s. l.], 2016.
- 640 QUINN, P. *et al.* **Clinical veterinary microbiology**. [s. l.]: Wolfe, 1994. ISBN
641 0723417113.
- 642 REIS, Filho Nazilton de Paula. **Comparação entre diferentes ondas de laser e**
643 **óleo de girassol ozonizado na epitelização de enxertos cutâneos aplicados**
644 **em feridas recém criadas de coelhos (*Oryctolagus cuniculus*) I**. 2019. Text —
645 Jaboticabal, [s.l.], 2019.
- 646 RESOLUÇÃO RDC nº 481, DE 15 DE março DE 2021 - DOU - imprensa nacional.
647 Disponível em: [resolução 481/2021](https://www.gov.br/ans/pt-br/assuntos/legislacao/resolucoes/2021/resolucao-rdc-481-2021). Acesso em: 25 maio 2022.
- 648 RUBIN, Mordecai B. The history of ozone. part III. **Helvetica Chimica Acta**, v. 86,
649 n. 4, p. 930-940, abr. 2003.
- 650 SALATINO, Antonio *et al.* Origin and chemical variation of Brazilian
651 propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2, n. 1,
652 p. 33-38, 2005.
- 653 SANCHEZ, Maria Del Pilar Rodriguez. **Estudo histomorfológico e**
654 **histomorfométrico da reparação tecidual na alveolite provocada em ratos**
655 **tratada por óleo ozonizado**. 2011. Published Version — Universidade de São
656 Paulo, [s. l.], 2011.
- 657 SANTANA, Henrique Freitas *et al.* Bactericidal activity of ethanolic extracts of
658 propolis against *Staphylococcus aureus* isolated from mastitic cows. **World Journal**
659 **of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 485-491, 17 jul. 2011.
- 660 SANTOS, André Luis dos *et al.* *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de
661 importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**,
662 v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007.
- 663 SASAKI, T. *et al.* Methicillin-Resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in a
664 veterinary teaching hospital. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 4, p. 1118-
665 1125, 31 jan. 2007.
- 666 SASAKI, T. *et al.* Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus*
667 *intermedius* strains. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n. 9, p. 2770-2778,
668 27 jun. 2007.
- 669 SCHWARZ, Stefan *et al.* Assessing the antimicrobial susceptibility of bacteria
670 obtained from animals. **Veterinary Microbiology**, v. 141, n. 1-2, p. 1-4, fev. 2010.
- 671 SFORCIN, José Maurício; BANKOVA, Vassya. Propolis: is there a potential for the
672 development of new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 253-
673 260, jan. 2011.
- 674 SILVA, Bruno B. *et al.* Chemical composition and botanical origin of red propolis, a
675 new type of brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative**
676 **Medicine**, v. 5, n. 3, p. 313-316, 2008.

- 677 SINHORINI, Wellington Augusto *et al.* Atividade antibacteriana in vitro da própolis
678 testada em cepas bacterianas padrão. **Revista de Ciência Veterinária e Saúde**
679 **Pública**, v. 1, n. 2, p. 107, 14 mar. 2015.
- 680 SORIANO, Nestor U.; MIGO, Veronica P.; MATSUMURA, Masatoshi. Functional
681 group analysis during ozonation of sunflower oil methyl esters by FT-IR and
682 NMR. **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 126, n. 2, p. 133-140, dez. 2003.
- 683 SORIANO, Nestor U.; MIGO, Veronica P.; MATSUMURA, Masatoshi. Ozonation of
684 sunflower oil: spectroscopic monitoring of the degree of unsaturation. **Journal of**
685 **the American Oil Chemists' Society**, v. 80, n. 10, p. 997-1001, out. 2003.
- 686 STEGMANN, R. *et al.* Human infection associated with methicillin-resistant
687 *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. **Journal of Antimicrobial**
688 **Chemotherapy**, v. 65, n. 9, p. 2047-2048, 1 jul. 2010.
- 689 TELLEZ, Goitybell Martinez; LOZANO, Oscar Ledea; GÓMEZ, Maritza F. Díaz.
690 Measurement of peroxidic species in ozonized sunflower oil. **Ozone: Science &**
691 **Engineering**, v. 28, n. 3, p. 181-185, jul. 2006.
- 692 TRAVAGLI, Valter *et al.* Effects of ozone blood treatment on the metabolite profile
693 of human blood. **International Journal of Toxicology**, v. 29, n. 2, p. 165-174, mar.
694 2010.
- 695 VAN DUIJKEREN, E. *et al.* Review on methicillin-resistant *Staphylococcus*
696 *pseudintermedius*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 66, n. 12, p. 2705-
697 2714, 19 set. 2011.
- 698 VAN HOOVELS, L. *et al.* First case of *Staphylococcus pseudintermedius* infection
699 in a human. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 44, n. 12, p. 4609-4612, 18 out.
700 2006.
- 701 VARGAS, Agueda Castagna de *et al.* Atividade antimicrobiana "in vitro" de extrato
702 alcóolico de própolis. **Ciência Rural**, v. 34, n. 1, p. 159-163, fev. 2004.
- 703 WEESE, J. Scott; VAN DUIJKEREN, Engeline. Methicillin-resistant *Staphylococcus*
704 *aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary**
705 **Microbiology**, v. 140, n. 3-4, p. 418-429, jan. 2010.
- 706 WINN JR, Washington C. *et al.* **Koneman, diagnóstico microbiológico: texto e**
707 **atlas colorido**. Tradução: Eiler Fritsch Toros. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara
708 Koogan, 2010. ISBN 978-85-277-1377-1.
- 709 ZANARDI, Iacopo *et al.* Physico-Chemical characterization of sesame oil
710 derivatives. **Lipids**, v. 43, n. 9, p. 877-886, 5 ago. 2008.
- 711

712

713

5 CAPÍTULO 2

714

Artigo

715

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

716

717

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DA

718

PRÓPOLIS EM *Staphylococcus pseudintermedius* MULTIDROGA RESISTENTE

719

ISOLADOS DE OTITE E PIODERMITE SUPERFICIAL DE CÃES

720

721

Resumo

722

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.

726

727

728

729

730

731

732

733

734

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

735

736

737

Abstract

738

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

739

740

741

742

743

744 showed a variation of MIC between 12.5% and 75% and with action in 24 hours 1.5% and
745 50%, the bactericidal effect occurred at both times. The mean minimum inhibitory
746 concentrations were 30.7 (± 14.2) for action at 1 hour and 18.6 (± 13.9) for action at 24 hours,
747 indicating a significant mean difference (GLMM Gamma: $\chi^2 = 19.33$, $P \leq 0.001$). This
748 correlation contributed to the validation of the theory that a longer contact time is necessary
749 for more efficient results against *S. pseudintermedius* MDR samples.

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

751

752 **Introdução**

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

759 Os fatores de virulência como: produção de coagulase, presença de cápsula, produção
760 de toxinas hemolíticas, enterotoxinas, lipases, proteases e a presença de proteína M na parede
761 celular dos *Staphylococcus* spp. permitiram definir os membros do gênero entre espécies
762 patogênicas e oportunistas e determinam o seu potencial para causar infecções (Mcvey *et*
763 *al.*, 2016). *S. pseudintermedius*, é reconhecido como principal agente em isolados oriundos
764 de otites e piодermite superficiais em cães (Bond e Loeffler 2012; Bannhoer e Guardabassi,
765 2012).

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

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

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

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

785

786 **Material e Métodos**

787 **Amostras**

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

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

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

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

811

812 **Obtenção do extrato da própolis marrom**

813 A própolis bruta foi coletada nos meses de novembro do ano de 2018 a março de
814 2019 a partir de 15 colmeias da abelha *Apis mellifera*, instaladas no Apiário Experimental da
815 Fazenda Escola da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da Universidade Federal
816 de Mato Grosso do Sul, situada no município de Terenos/MS, $20^{\circ}26'34''S$ $54^{\circ}50'27''O$,
817 com 530,7 m de altitude. A região tem como fontes vegetais as plantas apícolas da região
818 *Cecropia pachystachya*, *Mangifera indica*, *Tabebuia caraíba*, e *Vernonia polyanthes* e sua
819 classificação foi definida em estudo de Gomes *et al.*, (2016).

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

827 O extrato etanólico de própolis marrom utilizado possui parâmetros físico-químicos
828 (cera, resíduo seco, fenóis e flavonoides totais) que atendem as especificações adotados pela
829 legislação brasileira vigente e avaliados segundo a metodologia descrita por Funari e Ferro
830 (2006).

831

832 **Atividade antibacteriana do extrato alcoólico de própolis em uma hora e vinte e** 833 **quatro horas**

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

838 O extrato previamente preparado foi testado na concentração inicial (300.000 $\mu\text{g/ml}$)
839 e diluído sucessivamente em caldo Muller Hinton (MH), utilizando microplacas, nas
840 proporções 225.000 $\mu\text{g/ml}$, 150.000 $\mu\text{g/ml}$, 75.000 $\mu\text{g/ml}$, 37.500 $\mu\text{g/ml}$, 18.750 $\mu\text{g/ml}$,
841 9.375 $\mu\text{g/ml}$ e 4.685 $\mu\text{g/ml}$. A cada diluição adicionou-se 10 μL do inóculo bacteriano.

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

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

856

857 **Análise de dados**

858 Para determinar se ocorreu diferença média significativa na Concentração Inibitória
859 Mínima pela ação do extrato de própolis em dois tempos distintos (uma hora e 24 horas após
860 o período de incubação) foram construídos Modelos Gerais Linearizados Mistos (GLMM,
861 função glmmPQL, pacote MASS, Venables e Ripley, 2002). Esse método de análise foi
862 escolhido devido ao argumento na função [correlation=corAR1()] que faz a correção para
863 dados repetidos no tempo, desta forma, controlando possíveis efeitos de autocorrelação
864 temporal. Foi utilizada a distribuição de erros Gamma devido os valores da MIC serem
865 contínuos e positivos. Esta análise foi feita em ambiente R de programação (R Core Team
866 2022).

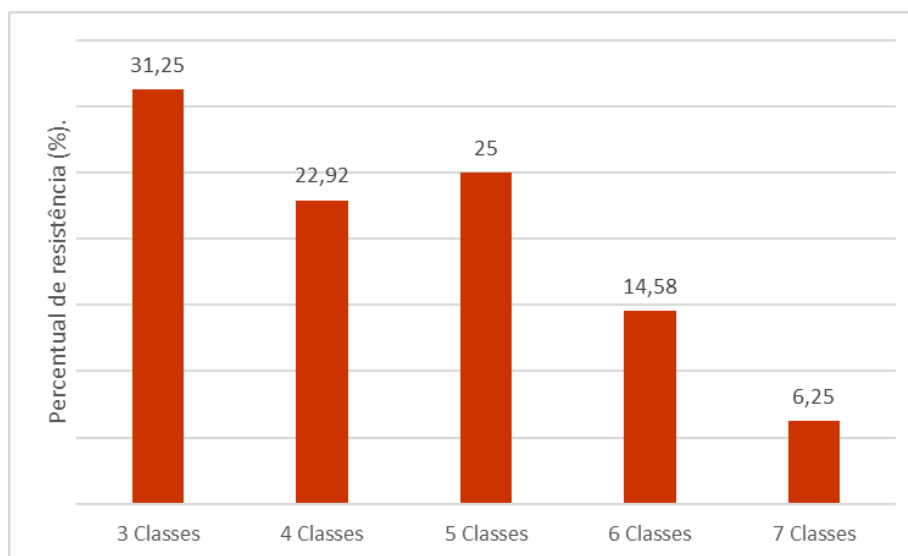
867

868 **Resultados e Discussão**

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

870 A análise das fichas e laudos de exames, realizados previamente pelo LABAC,
871 permitiu determinar o perfil de resistência e sensibilidade dos isolados às classes dos
872 antimicrobianos. Verificou-se que: 31,25% deles foram resistentes a três classes de
873 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) β - 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 (Enrofloxacino/ EN, norfloxacina/ NOR) 79,17% e aos
 898 macrolídeos (azitromicina / AZT) 60,42% é amplamente relatada para estafilococos. Para as

899 quinolonas ainda não existem mecanismos de inativação descritos e apesar de apresentarem
900 boa atividade contra estafilococos são inativas em cepas resistentes à meticilina e se
901 utilizadas isoladamente são menos eficazes. Já os macrolídeos segundo Brunton *et al.*,
902 (2010) não podem mais ser usados de modo confiável, a não ser que a sua sensibilidade *in*
903 *vitro* tenha sido documentada.

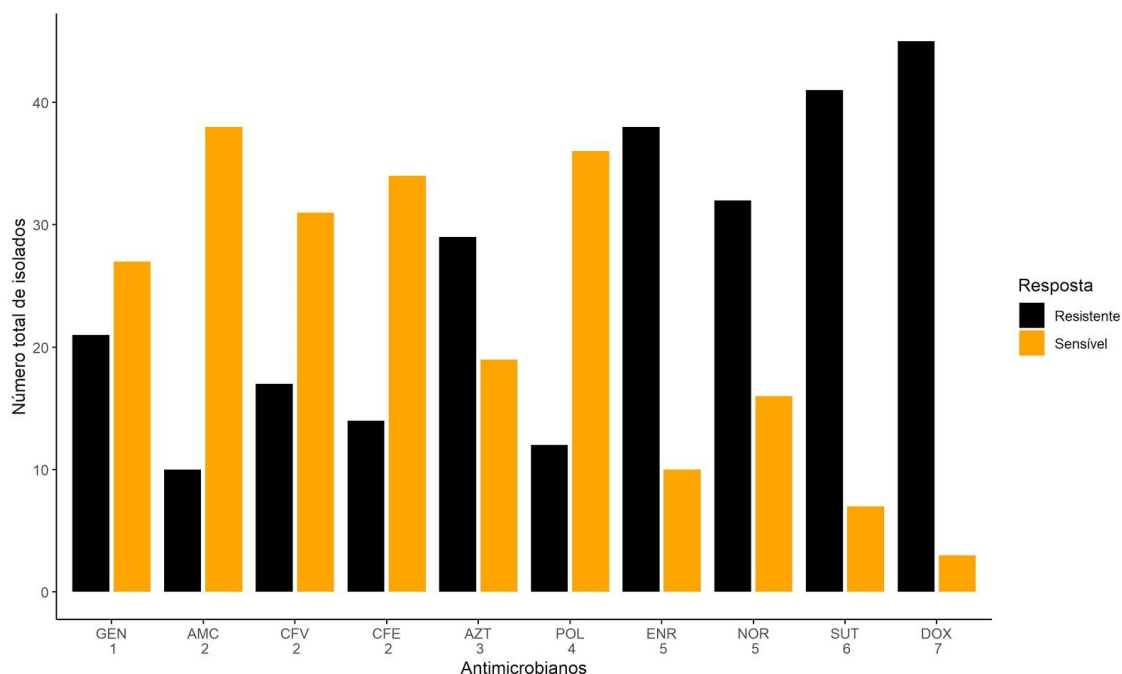
904 O perfil de resistência detectado nas amostras de *S. pseudintermedius* corrobora com
905 a afirmação de diversos autores sobre os elevados índices de resistência às várias classes de
906 antimicrobianos (Van Duijkeren *et al.*, 2011; Kadlec e Schwarz, 2012).

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

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

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

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



930

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

935 Extrato alcoólico de própolis

936 O extrato alcoólico de própolis (EAP) produzido na fazenda escola UFMS, município
 937 de Terenos, MS, utilizado neste estudo, foi previamente caracterizado por Gomes *et al.*,
 938 (2016) utilizando a metodologia descrita por Funari e Ferro (2006) e em conformidade com
 939 a legislação vigente (BRASIL, 2001). Os aspectos físicos como coloração, aspecto resinoso
 940 e rigidez permitiram caracterizar, indubitavelmente, como pertencente à variedade marrom.

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

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

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

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

960 O EAP a 30% deste estudo adota as características físicas e químicas pré-
961 estabelecidas que permanecem como primeiras descritas para própolis da região de
962 Terenos/MS e as análises quantitativas acerca da composição química ainda não foram
963 realizadas. Porém, considerando que a área destinada a manutenção do apiário está em uma
964 reserva de cerrado, e que não houve alteração significativa na flora local nas últimas décadas,
965 presume-se a manutenção do perfil bioquímico da própolis obtida da região, conforme
966 indicado pelos estudos de composição química realizados nos últimos anos (Gomes et al.,
967 2016; Ferraz, 2020).

968

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

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

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

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

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

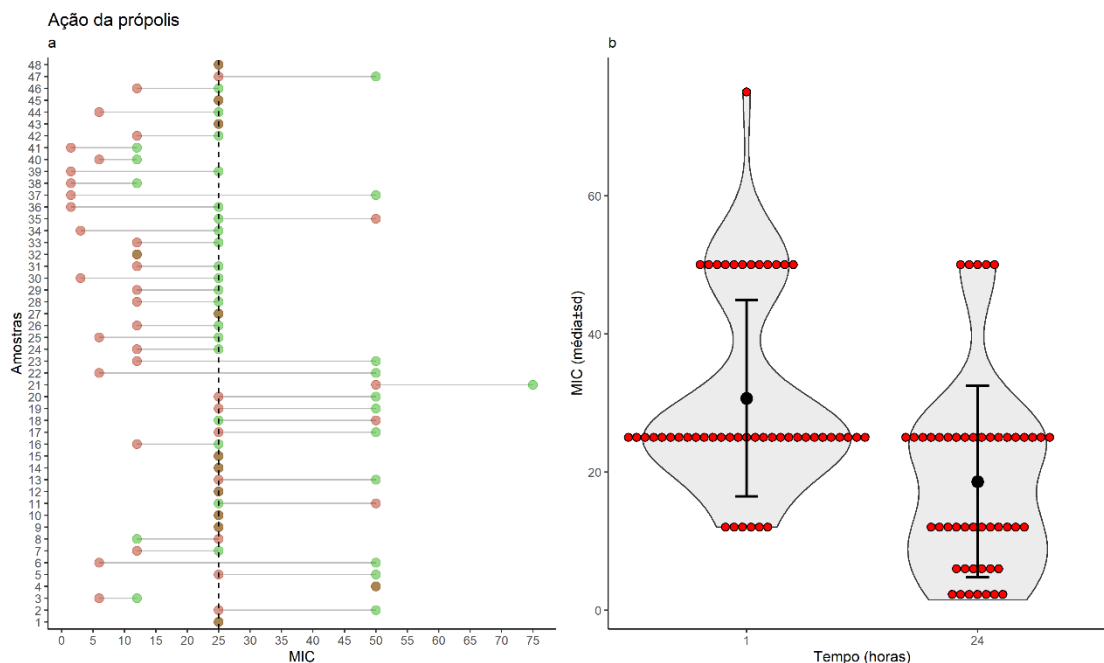
985 A concentração inibitória mínima obtida para ação do EAP frente aos 48 isolados de
986 *S. pseudintermedius* MDR em 1 hora variou de 12,5% (37.500 μ g/mL) a 75%
987 (225.000 μ g/mL), com média de 30,7% (\pm 14,2). O maior número das amostras, totalizando
988 35 (72,92%) teve inibição em concentrações abaixo da média e a maior densidade de dados
989 está representada por 29 (60,42%) isolados inibidos com MIC \leq 25 conforme demonstrado
990 na Fig. 3 (b).

991 Para ação em 24 horas a concentração inibitória mínima variou de 1,5%
992 (4.685 μ g/mL) a 50% (150.000 μ g/mL), com média de 18,6 (\pm 13,9). O total de 25 (52,09%)
993 isolados foram inibidos em concentrações abaixo da média (representados na Fig.3 (b)).
994 Estes resultados foram superiores aos apresentados por Gomes *et al.*, (2016) frente a
995 bactérias do gênero *Staphylococcus* de procedência canina e bovina, com EAP oriundo da
996 mesma localidade, porém com maior concentração (35%).

997 A média de concentração do EAP que teve efeito inibidor, 30,7 (\pm 14,2) e 18,6 (\pm 13,9)
998 para tempos 1h e 24h, respectivamente, apresentou diferença significativa (GLMM Gamma:
999 $\chi^2 = 19.33$, $P \leq 0.001$, Fig. 3 b).

1000 Esta diferença média significativa conflui com resultados de Picoli *et al.*, (2016) que
1001 analisaram a ação da própolis marrom da região sul do Brasil em micro-organismos
1002 causadores de mastite bovina, em diferentes tempos e concentrações inibitórias, obtendo
1003 resultados de eliminação para *Staphylococcus* spp. no tempo de exposição de duas horas na
1004 concentração de 25mg/mL, afirmando que a inibição é maior em função do tempo de
1005 exposição ao tratamento. Os dados deste estudo encontram-se na mesma faixa de inibição
1006 que demonstramos.

1007



1008

1009 Figura 3 (a) Distribuição dos valores de Concentração Inibitória Mínima (MIC) em 48 isolados *S.*
 1010 *pseudintermedius* MDR. Os círculos verdes correspondem à concentração inicial obtida no tempo 1, e os
 1011 círculos rosa correspondem à concentração obtida no tempo 2. Um único círculo corresponde a ausência de
 1012 variação na concentração inibitória mínima em função do tempo. (b) Médias (\pm dp) da concentração inibitória
 1013 mínima em função do tempo de incubação pela ação do extrato de própolis. Os pontos em vermelho atrás das
 1014 médias e desvios padrão representam os valores brutos, e a área em cinza é a densidade da distribuição dos
 1015 pontos.

1016 Para o grupo controle, *S. aureus* ATCC 25923 e *S.pseudintermedius* não MDR os
 1017 valores da concentração inibitória mínima estão exibidos na Tab. 1 e pode-se afirmar que
 1018 ambos foram inibidos em concentrações abaixo das médias obtidas para *S. pseudintermedius*
 1019 MDR nos dois tempos de ação. O parâmetro comparativo deste resultado é mais relevante
 1020 para ação em 24 horas, que é a metodologia aplicada nos estudos pela maioria dos autores.

1021

1022 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	≤ 25	≤ 06
<i>S.pseudintermedius</i> não MDR	≤ 25	≤ 12

1023

1024 Sinhorini *et al.*, (2014), para extrato de própolis comercial, referem sensibilidade
1025 para cepa padrão *S. aureus* ATCC 25923 de 0,25%, valor esse inferior ao resultado
1026 apresentado no presente estudo.

1027 Dantas-Silva *et al.*, (2017) avaliaram as atividades biológicas da própolis verde,
1028 vermelha e marrom, produzidas em várias regiões do Brasil. A própolis marrom dos estados
1029 de SC, PR e RS não apresentaram bom desempenho para cepas ATCC de *S. aureus*, com
1030 valores inibitórios acima de $>1000\mu\text{g/mL}^{-1}$, mais uma vez indicando que fatores como
1031 tempo de ação, metodologia e a diversidade da composição química do EAP, dificultam os
1032 parâmetros comparativos, mesmo quando direcionados para cepas padrão. No estudo citado
1033 a própolis vermelha apresentou desempenho superior nos parâmetros avaliados. Em
1034 concordância com Machado *et al.*, (2016), pode-se supor que os compostos responsáveis
1035 pela ação antimicrobiana significativa sejam os constituintes fenólicos, pois, o EAP de
1036 própolis marrom comparado ao extrato da própolis vermelha apresenta menor ação
1037 antimicrobiana.

1038 A atividade inibitória de um extrato de própolis, do estado da Bahia, foi avaliada por
1039 Santos *et al.*, (2019) frente a isolados de *Staphylococcus* de mastite caprina. Os autores
1040 testaram diferentes solventes e verificaram que o extrato alcóolico teve melhor desempenho
1041 que o extrato acetato e o hexânico. Esse estudo confirma que o tipo de processamento para
1042 obtenção e extração do composto própolis também tem influência direta sobre sua atividade
1043 biológica, podendo favorecer a atividade de alguns compostos em detrimento a outros. Neste
1044 caso, a extração alcóolica favoreceu a presença de compostos antibacterianos levando a
1045 inibição dos isolados com CIM que variou de 97-12500 $\mu\text{g/mL}$.

1046 Outro fator a se indicar sobre processamento dos extratos, e sua relação com
1047 eficiência, é o fator concentração inicial ou processada. Em geral os estudos são realizados
1048 com extratos cuja concentração inicial varia entre 25 a 35%. Em alguns trabalhos pode ser
1049 adotado o método de efetuar a concentração do extrato após sua obtenção, sendo esperado
1050 que, diante da diferença de processamento, ocorra variação na atividade biológica.

1051 O EAP de própolis verde foi avaliado na inibição de *S. pseudointermedius*, de dois
1052 isolados clínicos de cães, em estudo realizado por Barbosa *et al.*, (2022). O estudo alcançou
1053 CIM de 0,156mg/mL para os dois isolados. Este valor indica que o referido EAP teve grande
1054 eficiência na inibição *in vitro*, sendo consideravelmente mais ativo que o extrato que
1055 avaliamos de própolis marrom. Os autores empregaram uma etapa de evaporação para
1056 concentração do extrato antes dos ensaios. Considerando esse processo, além da diferença
1057 na classificação da própolis, é possível perceber que a própolis possui identidade própria,

1058 não sendo possível ter um padrão único de atividade biológica. Porém é possível, a partir do
1059 conhecimento de sua composição, empregar diferentes estratégias para otimização da
1060 eficiência. Isso pode incluir o tipo de formulação, diferentes veículos ou associação com
1061 outros compostos.

1062 O diferencial no estudo aqui apresentado é o fato de que todas as amostras testadas,
1063 são de origem clínica e MDR. O EAP que foi avaliado, em geral, teve desempenho inferior
1064 se comparado a outros estudos realizados em outras regiões do país ou do mundo. Porém é
1065 importante notar que a maior resistência das amostras ao EAP pode ter correlação com a
1066 resistência prévia a antimicrobianos convencionais. Este não é um evento fácil de ser
1067 comprovado uma vez que o mecanismo exato de ação da própolis não está completamente
1068 elucidado. Há um consenso sobre alguns desses possíveis modos de ação, como por exemplo
1069 o aumento da permeabilidade de membrana, inibição da produção de ATP, redução da
1070 mobilidade bacteriana, alteração no potencial de membrana e interferência no processo de
1071 síntese de DNA e RNA (PRZYBYLEK e KARPISNKI, 2019; ALMUHAYAWI, 2020).

1072 Considerando que amostras bacterianas MDR podem sofrer alterações estruturais,
1073 nota-se a necessidade de estudos complementares para aprofundar a investigação sobre a
1074 possibilidade de correlação entre aquisição de resistência a antimicrobianos e menor
1075 sensibilidade a ação de um composto que atua como a própolis.

1076 O potencial terapêutico da própolis em formulações para uso tópico foi investigado
1077 *in vivo*, em estudo que avaliou seu efeito em cães portadores de otite, em tratamento durante
1078 14 dias. O grupo controle, também portador da infecção, recebeu solução placebo, com a
1079 mesma frequência e pelo mesmo período de tempo. Ao comparar a evolução clínica e
1080 parâmetros de diagnóstico microbiológico, os autores constataram que houve eliminação da
1081 infecção no grupo teste (71%) em comparação ao grupo controle, no qual não houve
1082 recuperação de nenhum dos animais. O estudo também verificou a ausência de reações
1083 adversas, demonstrando segurança no uso da formulação (LOZINA *et al.*, 2010).

1084 Importante destacar que todos os estudos empregando própolis nativa, contribuem
1085 para validar o potencial uso dessa substância no controle de infecções superficiais. No
1086 entanto, devemos observar que a própolis verde, assim como a vermelha, tem sua presença
1087 assinalada em regiões específicas no Brasil, dificultando o alcance amplo do seu uso. Dessa
1088 forma, ressaltamos que avaliar a própolis de forma regionalizada contribui para o
1089 conhecimento do seu potencial uso e possibilidades de aplicação em terapias direcionadas,
1090 gerando além dos benefícios diretos esperados, a possibilidade de se estabelecer uma cadeia
1091 de produção com impacto social e econômico.

1092

1093 Adicionalmente os testes em linhagens bacterianas de origem animal são escassos, a
1094 investigação da ação bacteriostática e bactericida, bem como a diversidade química da
1095 própolis marrom oriunda da região de Terenos/ MS podem ser objeto de estudos futuros.

1096

1097 **Conclusão**

1098 As cepas bacterianas de *S. pseudintermedius* MDR caracterizadas neste estudo
1099 apresentam elevado grau de resistência para as classes antimicrobianas comumente
1100 empregadas no tratamento de otite e piodermite superficial em cães.

1101 A própolis marrom da região de Terenos/ MS apresenta potencial bactericida frente
1102 às amostras de *S. pseudintermedius* MDR e este potencial é ampliado em função do tempo
1103 de ação.

1104

1105 **Referências**

1106 ALMUHAYAWI, M.S. Propolis as a novel antibacterial agent. *Saudi J. Biol. Sci.* 2020, 27,
1107 3079–3086.

1108 BANNOEHR, Jeanette; GUARDABASSI, Luca. *Staphylococcus pseudintermedius* in the
1109 dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary**
1110 **Dermatology**, v. 23, n. 4, p. 253—e52, 19 abr. 2012.

1111 BARBOSA, Eunice V. *et al.* *In vitro* comparison between antimicrobial and antibiofilm
1112 effects of Green Propolis and *Baccharis dracunculifolia* against *Staphylococcus*
1113 *pseudintermedius* isolate. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 3, 2022.

1114 BOND, R.; LOEFFLER, A. What 's happened to *Staphylococcus intermedius*? Taxonomic
1115 revision and emergence of multi-drug resistance. **Journal of Small Animal Practice**, v. 53,
1116 n. 3, p. 147-154, 17 jan. 2012.

1117 BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação.
1118 Instrução Normativa n.3, de 19 de janeiro de 2001. **Aprova os regulamentos técnicos de**
1119 **identidade e qualidade de Apitoxina, Cera de Abelha, Geléia Real, Geléia Real**
1120 **Liofilizada, Pólen Apícola, Própolis e Extrato de Própolis**
1121 [https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal= 1 & pagina= 46 &](https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal= 1 & pagina= 46 & data=23/01/2001)
1122 [data=23/01/2001](https://pesquisa.in.gov.br/imprensa/jsp/visualiza/index.jsp?jornal= 1 & pagina= 46 & data=23/01/2001). Acesso em: 29/06/2022.

1123 BRUNTON, Laurence L. *et al.* **Goodman e Gilman' s: Manual de farmacologia e**
1124 **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

1201

1202

6 CAPÍTULO 3

1203

Artigo

1204

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

1205

1206

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *IN VITRO* DO ÓLEO DE

1207

GIRASSOL OZONIZADO EM *Staphylococcus pseudintermedius* MULTIDROGA

1208

RESISTENTE ISOLADOS DE OTITE E PIODERMITE SUPERFICIAL DE CÃES

1209

1210

Resumo

1211

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.

1224

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

1225

1226

Abstract

1227

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

1232

1233 vitro, 48 clinical isolates of otitis and pyoderma from dogs were submitted to the
1234 microdilution plate technique to determine the minimum inhibitory concentration (MIC).
1235 Sunflower oil was subjected to the ozonolysis process for 12 hours, then it was diluted in
1236 concentrations from 100 to 1.5%. The samples submitted to the test with the oil were
1237 inhibited with MIC that varied between 3% and 50%. This result is compatible with the
1238 bactericidal effect of ozonated sunflower oil, which may be of interest for topical therapy
1239 used in the treatment of superficial skin disorders in dogs.

1240 **Key words:** Antimicrobial activity, sunflower oil, ozone, dogs,

1241

1242 **Introdução**

1243 Os processos bacterianos que acometem orelha e pele (otite e piodermites
1244 superficiais) em cães são um problema recorrente e responsáveis por cerca de 20 a 75% dos
1245 atendimentos clínicos em medicina veterinária. Os principais agentes envolvidos nestes
1246 processos infecciosos são as bactérias do gênero *Staphylococcus* que têm apresentado uma
1247 elevada taxa de resistência aos antimicrobianos disponíveis para o tratamento de animais de
1248 companhia (Hill *et al.*, 2006; Marinho, 2020).

1249 Os fatores de virulência como: produção de coagulase, presença de cápsula, produção
1250 de toxinas hemolíticas, enterotoxinas, lipases, proteases e a presença de proteína M na parede
1251 celular dos *Staphylococcus* spp. permitiram definir os membros do gênero entre espécies
1252 patogênicas e oportunistas e determinam o seu potencial para causar infecções (Mcvey *et*
1253 *al.*, 2016).

1254 Em medicina veterinária podemos dar ênfase e classificar diferentes espécies do
1255 grupo dos estafilococos, a exemplo disto, temos o *S. pseudintermedius*, tido como principal
1256 agente em isolados oriundos de otites e piodermites superficiais em cães (Bond e Loeffler
1257 2012; Bannhoer e Guardabassi, 2012).

1258 A detecção de cepas do *S. pseudintermedius* resistentes a muitas classes de
1259 antimicrobianos já foi descrita, bem como seu potencial zoonótico e é consenso que a
1260 transmissão interespecie é fator determinante para o desenvolvimento de cepas
1261 multirresistentes (Kadlec e Schwarz, 2012; Weese e Van Duijkeren, 2011).

1262 A necessidade de minimizar o uso ou até mesmo substituir o uso dos fármacos
1263 antimicrobianos é uma preocupação mundial, A ação antimicrobiana do óleo de girassol
1264 ozonizado possui um amplo espectro que inclui cepas bacterianas resistentes Gram- positivas
1265 e negativas (Sechi *et al.*, 2001).

1266 Estudos com a finalidade de apontar compostos com capacidade antibacteriana têm
1267 sido objeto de grande interesse por parte dos cientistas. Considerando a importância clínica
1268 das piодermites e otites na casuística de atendimentos em clínicas de pequenos animais e o
1269 aumento da detecção da multirresistência do mais comum agente causador de distúrbios
1270 cutâneos, o objetivo deste estudo foi avaliar a sensibilidade de isolados do *S.*
1271 *pseudintermedius* MDR frente a ação do óleo de girassol ozonizado.

1272

1273 **Material e Métodos**

1274 **Amostras**

1275 As bactérias utilizadas no estudo foram provenientes da coleção biológica, do
1276 Laboratório de Bacteriologia da FAMEZ/UFMS, cadastrada no SISGEN sob o número C
1277 69392 e obtidas de processos clínicos infecciosos superficiais de pele e orelha em cães
1278 domésticos. Foram usadas 48 amostras de *S.pseudintermedius* MDR com perfil de
1279 resistência previamente caracterizado por meio da técnica de disco difusão conforme
1280 orientação do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (Marinho, 2020) e
1281 classificados segundo a metodologia proposta por Schwarz *et al.*, 2010.

1282

1283 **Reativação das amostras bacterianas**

1284 As amostras bacterianas foram reativadas em caldo infusão de cérebro e coração
1285 (BHI) e o teste de pureza e viabilidade realizado em agar BHI e agar manitol salgado. Foram
1286 escolhidas algumas colônias bem isoladas que foram repicadas em caldo Mueller Hinton. A
1287 padronização do inóculo foi realizada pela equiparação da turvação do repique com o tubo
1288 0,5 da escala de Mac Farland, que corresponde ao número de $1,5 \times 10^8$ bactérias/mL. Esse
1289 inóculo foi usado para avaliar o potencial inibitório do óleo de girassol ozonizado.

1290

1291 **Obtenção do óleo ozonizado**

1292 O óleo ozonizado foi produzido no Laboratório de Pesquisa 2 do INQUI/UFMS, em
1293 Campo Grande, MS. Foi utilizado óleo de girassol industrializado prensado a frio, que foi
1294 submetido a aparelho gerador de ozônio modelo Ozonofil (JE90009 DISULFIL). Para
1295 ozonização foi usado um reator de coluna de bolhas com capacidade de 150 mL de fluido,
1296 que foi mantido no aparelho por 12 horas à temperatura de 22°C. Antes do uso nos testes de
1297 inibição bacteriana o óleo de girassol foi submetido à análise físico-química e determinado

1298 os índices de: acidez (IA), iodo (II) e peróxido (IP) iniciais e após ozonólise. O
1299 armazenamento foi realizado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração.

1300

1301 **Atividade antibacteriana do óleo de girassol ozonizado**

1302 O ensaio de sensibilidade foi executado em placas de microtitulação de 96 poços. As
1303 concentrações do óleo de girassol ozonizado usadas foram: 100%, 75%, 50%, 25%, 12%,
1304 6%, 3% e 1,5% o que corresponde a 212,6µg/ml, 159,45µg/ml, 106,30µg/ml, 53,15µg/ml,
1305 26,57µg/ml, 13,28µg/ml, 6,64µg/ml, 3,32µg/ml, respectivamente.

1306 As placas de titulação de 96 poços contendo inóculo, e as diferentes concentrações
1307 do óleo diluídas em caldo Mueller Hinton e Tween polisorbato 80 foram incubadas em estufa
1308 a 37°C por 24 horas. Após esta etapa, todos os poços foram semeados em placas de ágar BHI
1309 as quais foram incubadas a 37°C *overnight*. A leitura das placas foi realizada pela observação
1310 do crescimento de colônias. Foi considerada eficiente a menor concentração na qual não
1311 houve qualquer tipo de crescimento bacteriano.

1312 Todos os ensaios foram realizados em duplicata, empregando como controles uma
1313 cepa *S. aureus* (ATCC 25923), um isolado clínico *S. pseudintermedius* não MDR, a
1314 viabilidade do inóculo, inóculo com gentamicina, esterilidade do Tween polisorbato 80 e do
1315 óleo de girassol ozonizado.

1316

1317 **Resultados e Discussão**

1318 **Caracterização do óleo de girassol puro e ozonizado por 12 horas.**

1319 O índice de acidez determinados para o óleo de girassol puro (OG-00) e ozonizado
1320 (OG-12) foram de 0.80 ± 0.26 para 8.39 ± 0.25 , ao comparar estes índices, conclui-se que o
1321 aumento é devido a formação dos compostos oxigenados durante a reação de ozonólise (Diaz
1322 *et al.*, 2006; Almeida *et al.*, 2013).

1323 Os índices de iodo (II) observados foram de 123.58 ± 1.02 (SO.0) e 62.61 ± 0.68 (OG-
1324 12) e a diminuição observada é consequência da reação do ozônio nas dupla ligações
1325 carbono-carbono, reduzindo o número de insaturações de ácidos graxos, uma vez que o (II)
1326 serve para quantificar as insaturações presentes (Shimamoto *et al.*, 2015). Esses valores estão
1327 de acordo com o que foi observado no espectro de RMN de ^1H da Fig. 6a, onde pode ser
1328 verificada a formação dos ozonídeos e a presença de insaturações.

1329 Os índices de peróxido encontrados foram $24.93 \text{ mEq Kg}^{-1} \pm 5.00$ para (OG-00) e
1330 $3019.33 \text{ mEq Kg}^{-1} \pm 65.62$ para (OG-12). A formação dos compostos oxigenados, os

1331 ozonídeos, faz com o IP aumente (Martínez- Sánchez *et al*, 2012) esta condição ocorre
1332 paralelamente à redução do (II) e foi observado neste estudo (Moureu et al., 2015).

1333 Representado na Tab. 2 estão os valores obtidos nas análises para determinação do
1334 índice de acidez (IA), índice de iodo (II) e índice de peróxido (IP), no (OG-00) e (OG-12)
1335 e demonstram o aumento do IA, IP e redução do IO que é compatível com tempos de
1336 ozonização mais longos.

1337

1338 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 ⁻¹)
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

1339

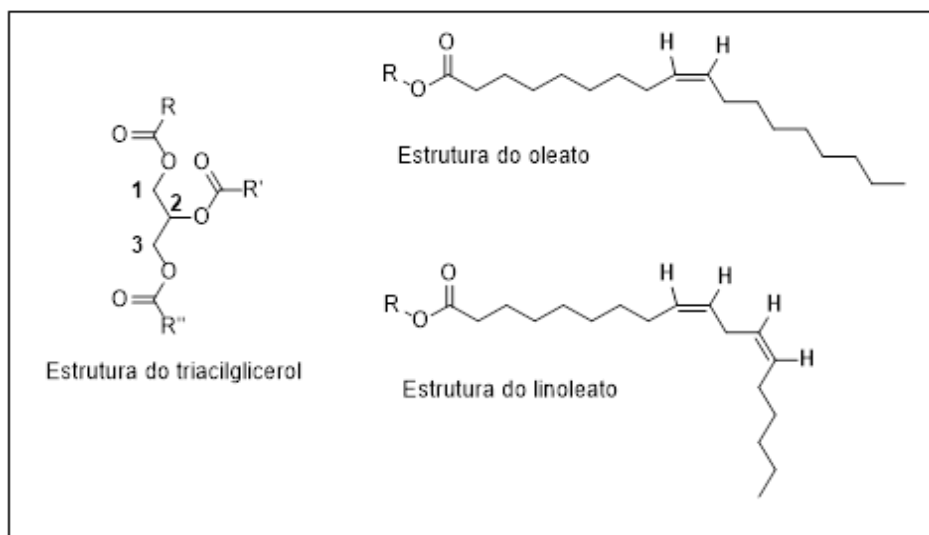
1340 **Caracterização físico-química e espectroscópica por Ressonância Magnética**
1341 **Nuclear (RMN) de ¹H e ¹³C**

1342 No espectro de RMN de ¹H do óleo de girassol puro (OG-00), observamos sinais
1343 com deslocamentos químicos referentes aos hidrogênios dos grupos que constituem as
1344 cadeias dos ácidos graxos dos triacilgliceróis: em 0,89 ppm, sinais dos hidrogênios do grupo
1345 metila terminal de cada cadeia de ácido graxo (-CH₂- CH₃); em 1,30 ppm, sinais atribuídos
1346 aos hidrogênios metilênicos (-CH₂-CH₂- CH₃); sinal em 1,61 ppm (multiplete), referente aos
1347 hidrogênios β- carbonila (COO-CH₂-CH₂-); 2,04 ppm (multiplete), que podem ser atribuídos
1348 aos hidrogênios alílicos (CH₂-CH=CH-CH₂-); em 2,31 ppm encontramos um tripleto
1349 compatível com hidrogênios α-carbonila (COO-CH₂-CH₂-) (Fig. 5a).

1350 Ainda neste espectro, em 2,77 ppm podemos verificar a presença de um tripleto
1351 referente aos hidrogênios do grupo CH₂ entre as insaturações da cadeia do linoleato do
1352 triacilglicerol (-CH=CH-CH₂-CH=CH-) (Fig. 4).

1353 Os hidrogênios da posição 1 e 3 do glicerol se encontram em 4,30 e 4,15 ppm (duplo
1354 dublete) e em 5,27 ppm é possível observar um multiplete referente ao hidrogênio da posição
1355 2 do glicerol (Fig. 4).

1356 Na região de 5,32 – 5,39 observamos os sinais dos hidrogênios olefínicos (-CH=CH-
1357) dos diferentes tipos de ésteres presentes na composição do óleo, destacando na Fig. 4 os
1358 dois ésteres que estão em maior proporção nos óleos de girassol (Díaz et al, 2012) (Fig. 5a).



1359

1360

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

1361

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

1362

1363

Os carbonos 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.

1364

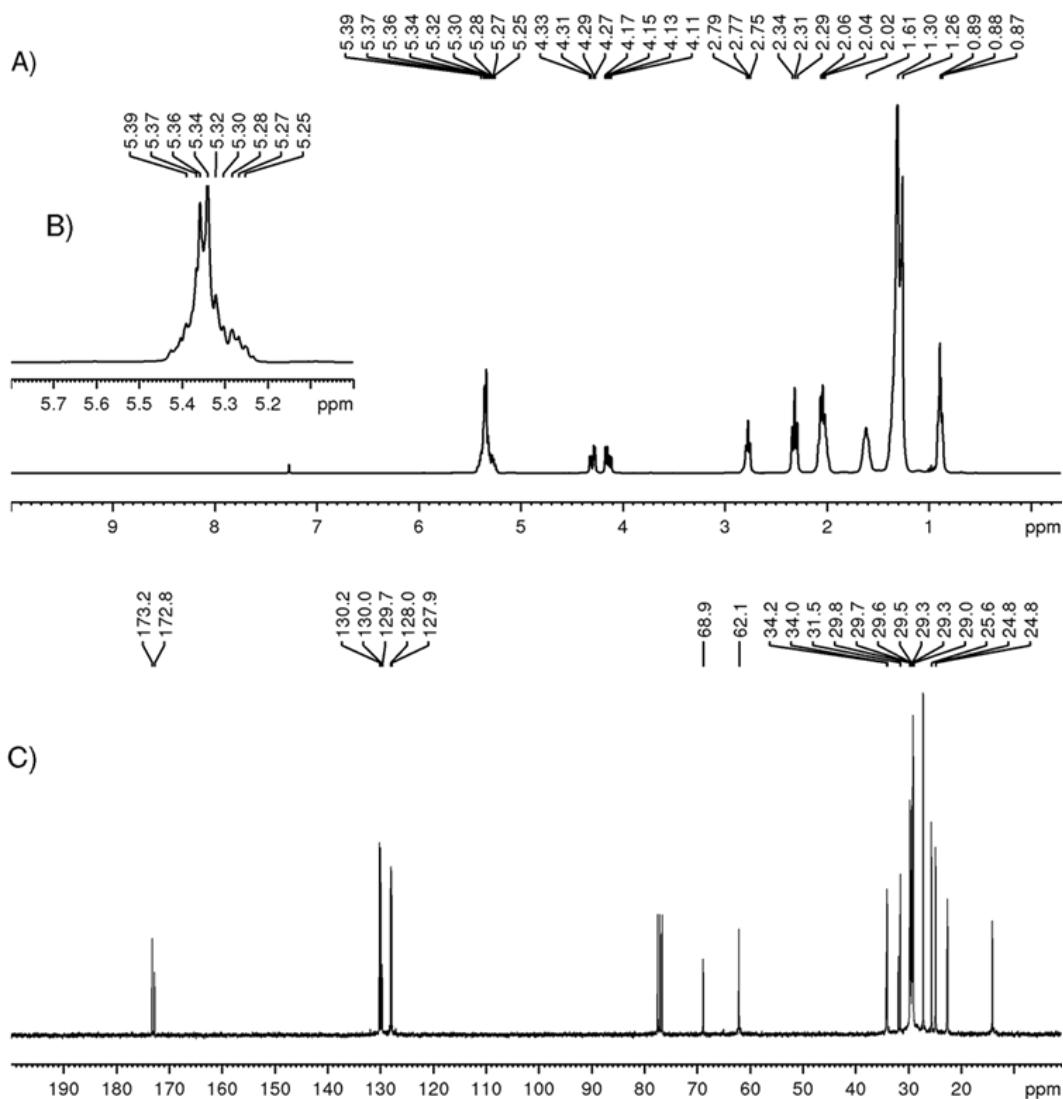
1365

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).

1366

1367

1368



1369

1370

1371

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

1372

1373

1374

1375

1376

No óleo ozonizado por 12 horas (OG-12) é possível observar a presença de novos sinais no espectro de ^1H 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}C em 103,4 – 104,4 ppm, o que comprova a formação dos ozonídeos (Fig. 6c).

1377

1378

1379

O multipletto em 5,56 ppm no espectro de RMN de ^1H 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.

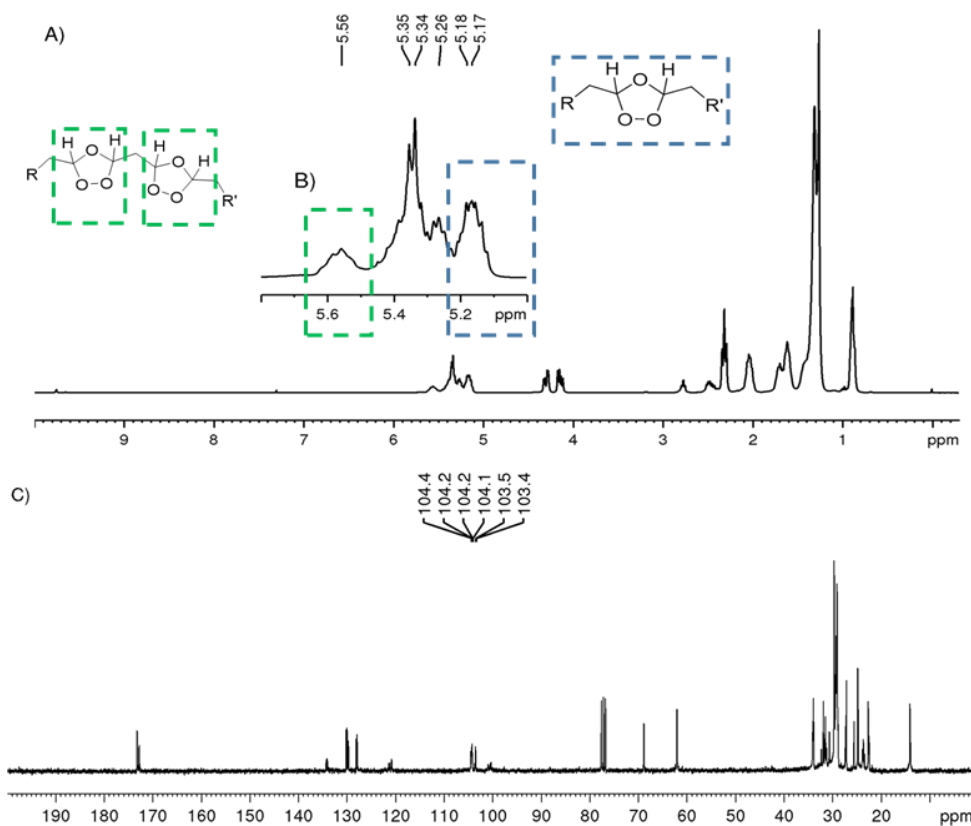
1380

1381

1382

1383

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



1384

1385

1386

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

1387

Testes de inibição pelo óleo de girassol ozonizado

1388

1389

1390

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 ($\pm 13,69$).

1391

1392

1393

1394

A maior parte dos isolados 29 (60,41%) foram inibidos com concentrações abaixo do valor médio e o maior número (14- 29,17%) com MIC ≤ 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.

1395

1396

1397

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 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	-

1398

1399 Os resultados da CIM apresentados para *S. pseudintermedius* MDR são menores
 1400 que os observados por Moureu et al., (2015), que para inibição de *S. aureus* utilizaram
 1401 óleo ozonizado em 7 horas com adição de água ao processo e obtiveram CIM de 0.625
 1402 a 1.25mg/mL com IP 2680 mEq Kg⁻¹. Os mesmos autores inferem que os valores de CIM
 1403 (menores) são atingidos com aumento do IP, isto foi observado neste estudo com
 1404 menores valores de MIC e maior valor do IP. Os autores relatam que as cepas estudadas
 1405 frente ao óleo ozonizado sem água tinham valores de CIM de 5 mg/mL ou superior e que
 1406 com a adição da água teve um efeito antibacteriano que foi melhorando com o tempo de
 1407 ozonização. Portanto, a função tempo e as condições de ozonização são determinantes
 1408 para o efeito significativo sobre a atividade antibacteriana.

1409 Almeida et al., (2013) relatam inatividade do óleo de girassol ozonizado por 12
 1410 horas com IP 1761.87 mEq Kg⁻¹ frente *S. aureus* ATCC 25923, e neste estudo houve
 1411 inibição das cepas controle com resultados expresso na Tab. 4.

1412

1413 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

1414

1415 Esta diferença pode estar relacionada aos níveis superiores de IP atingidos no
 1416 presente estudo, bem como na técnica empregada para determinação da MIC que foi a
 1417 microdiluição em caldo.

1418 A ação antibacteriana de óleos ozonizados é relatada para bactérias Gram-
 1419 positivas e Gram- negativas, Zanardi et al., (2013), avaliaram a viabilidade bacteriana
 1420 relacionando tempo de ação, IP e duas concentrações diferentes de óleo ozonizado
 1421 através da técnica de suspensão em caldo referindo maior sensibilidade para *S. aureus*
 1422 mesmo em níveis inferiores de peróxido e em ação de 1 hora.

1423 Segundo Curtiellas, (2014), a ação do óleo ozonizado em *S. aureus* e outras
1424 células bacterianas ocorre pela perda de íons K⁺ intracelular induzindo reações do
1425 conteúdo citoplasmático que afetam a permeabilidade das células e o processo oxidativo
1426 causa danos irreversíveis a parede bacteriana. Portanto, para isolados de *S.*
1427 *pseudintermedius* MDR em virtude das semelhanças ao *S. aureus* podemos esperar o
1428 mesmo mecanismo de ação e a atividade bactericida evidenciada é relacionada ao nível
1429 de IP.

1430 Para estudos *in vitro* frente a micro-organismos patogênicos, segundo Díaz et al.,
1431 (2006) as diferenças na concentração de ácidos graxos contidos nos óleos vegetais não
1432 são relevantes na ação antibacteriana. Contudo, óleos mais ricos em ácidos graxos,
1433 quando ozonizados, formam mais compostos responsáveis pela atividade
1434 antimicrobiana, conclusão esta também relatada por Moureu et al., (2015).

1435 Portanto, para comprovar a atividade biológica dos óleos ozonizados a
1436 determinação do índice de peróxido é a principal evidência e o tempo de ozonização
1437 influi diretamente neste índice. Mesmo que observada a ação bactericida *in vitro* do óleo
1438 de girassol ozonizado frente a *S. pseudintermedius* MDR, estudos que avaliem e
1439 determinem os níveis de toxicidade são relevantes antes da aplicação *in vivo* como terapia
1440 de uso tópico.

1441

1442 **Conclusão**

1443 O óleo de girassol ozonizado por 12 horas possui ação bactericida *in vitro* frente aos
1444 isolados de *S. pseudintermedius* MDR e estudos sobre a toxicidade são necessários antes da
1445 indicação do mesmo como alternativa tópica para tratamento de otites e piodermites
1446 superficiais.

1447

1448 **Referências**

1449 ALMEIDA, Nathália R. *et al.* Ozonized vegetable oils and therapeutic properties: a review.
1450 **Orbital - The Electronic Journal of Chemistry**, v. 4, n. 4, 18 jan. 2013.

1451 BANNOEHR, Jeanette; GUARDABASSI, Luca. *Staphylococcus pseudintermedius* in the
1452 dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. **Veterinary**
1453 **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 piодermite 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

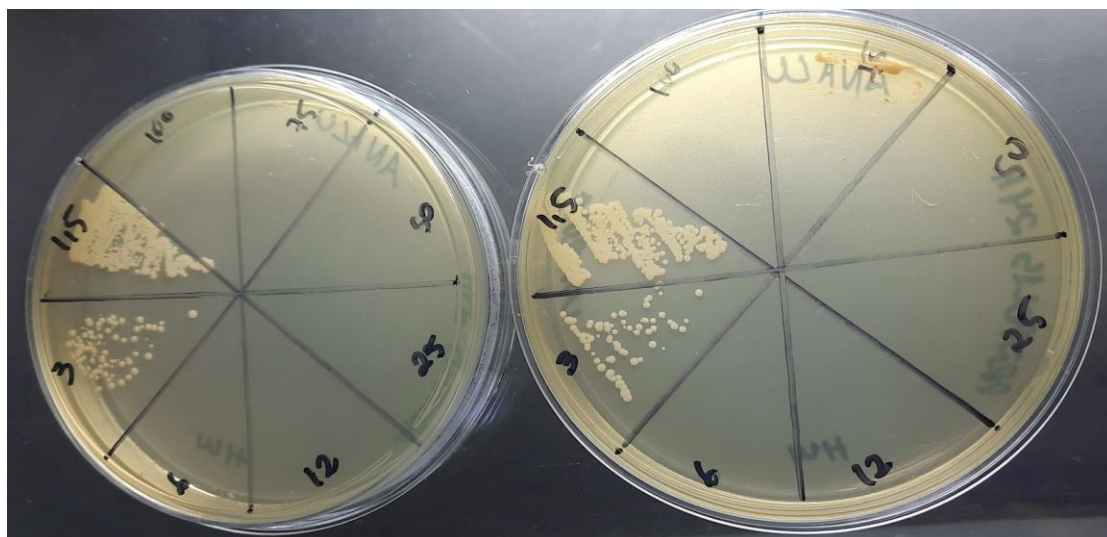
Determinação da MIC dos isolados

1496

Leitura da MIC								
↓→	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
1498
1499

1 = crescimento bacteriano
0 = ausência de crescimento bacteriano

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

Capítulos 1 e 2: Formatados conforme as normas do periódico: Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia, disponível no link:

1509

1510

<http://www.scielo.br/revistas/abmvz/iinstruc.h>



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.

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 Conmittee" (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.

1513

1514

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: Explanação 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 clostridios. 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/MiamiHerld-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.
- 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.

[[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

1518

1519

1520

1521

1522

1523

ANEXOS

1524 Perfil de resistência e sensibilidade das 48 amostras de *S. Pseudintermedius*
 1525 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

1526

1527

1528

1529

ANEXO

1530 Resultados dos testes controle, determinação das concentrações inibitórias
 1531 mínimas do extrato alcoólico da própolis marrom/Terenos – MS e óleo de girassol
 1532 ozonizado por 12 horas nas 48 amostras de *S. Pseudintermedius* oriundas de
 1533 orelha e pele de cães.

ID. Nº	Coagulase	Inóculo	Própolis	Óleo Oz.	Tween 80	Álcool	Inóculo+Genta.	MIC Prop. 1hora	MIC Prop. 24horas	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

1534

1535

ANEXO

1536 Perfil de resistência e sensibilidade da amostra de *S. Pseudintermedius* não MDR
 1537 e *S. aureus* ATCC 25923.

1538

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

1539

1540

1541

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.

1542

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