

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE
PRÓPOLIS
FRENTE A ISOLADOS DE
STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA E
MALASSEZIA PACHYDERMATIS DE OTITE CANINA**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rosemari Laura Cardoso

SANTA MARIA, RS, BRASIL

2009

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE
PRÓPOLIS FRENTE A ISOLADOS DE
STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA E
MALASSEZIA PACHYDERMATIS DE OTITE CANINA**

Por

Rosemari Laura Cardoso

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Área de Concentração em Medicina Veterinária Preventiva, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Medicina Veterinária.**

Orientadora: Profa. Dr^a Agueda Castagna de Vargas

Santa Maria, RS, Brasil, 2009.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA VETERINÁRIA**

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
aprova a Dissertação de Mestrado

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO
DE PRÓPOLIS FRENTE A ISOLADOS DE
STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA E
MALASSEZIA PACHYDERMATIS DE OTITE CANINA**

Elaborado por

Rosemari Laura Cardoso

como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Medicina Veterinária

COMISSÃO EXAMINADORA:

Agueda Castagna de Vargas, Dr^a
(Presidente/Orientador)

Marisa Ribeiro de Itapema Cardoso , DR^a. (UFGRS)

Sydney Hartz Alves, Dr. (UFSM)

Santa Maria, 18 de fevereiro de 2009.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho à minha tia Beatriz,
que foi mãe e pai na minha vida.
Brilhante e sábia
que me ensinou a valorizar o estudo e a disciplina.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por todas as oportunidades e chances que Ele me proporcionou na vida.

À minha família, em especial minha Tia/Mãe Beatriz, que sempre me apoiou e me ajudou em todos os momentos, tanto profissionais como pessoais.

À professora Agueda, que além de orientadora foi a minha mãe durante o período que estive longe de casa, me apoiando, cuidando de mim, entendendo minhas dificuldades. E principalmente me puxando a orelha na hora certa para que eu pudesse terminar o mestrado não somente como mestre, mas como laboratorista, como professora e bacteriologista.

À ex-professora Valéria Dutra, que confiou em mim, me incentivou por acreditar no meu potencial.

À minha amiga Arleana, com quem aprendi os primeiros passos da rotina laboratorial, tendo muita calma e paciência comigo.

A toda equipe LABAC, pois sem a participação dela o projeto não se realizaria.

Agradeço à Rosangela que além de companheira de laboratório, é grande amiga que está sempre por perto me ouvindo e me apoiando.

Em especial meu parceiro de projeto, Gustavo Machado onde sua colaboração foi de grande valia. Esse projeto é nosso! Conseguimos!

A Franciele Maboni, pela cooperação, compreensão e amizade, mesmo a distância soube fazer a diferença entre os que estiveram sempre presentes.

Às minhas amigas, ex- companheiras de pensão, Fernanda, Rúbia, Jaqueline, Daniela, Taís e Marciana. Em especial a Idelma, que continuou minha grande amiga nessa terra distante.

Às amigas de Cuiabá, que me incentivaram desde o início; Magyda, Erô, Aline Carvalho, Rose Arruda, Tatiane, Regiane e Silvânia.

Ao meu namorado, amigo, companheiro e conselheiro Sandro Silva, que aturou muitos momentos de estresse, com muita calma e paciência, auxiliando inclusive no trabalho.

E aos meus cachorros, que são e sempre serão o meu grande incentivo em ser Médica Veterinária.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO EXTRATO DE PRÓPOLIS FRENTE A ISOLADOS DE *STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVA* E *MALASSEZIA PACHYDERMATIS* DE OTITE CANINA

Autora: Rosemari Laura Cardoso
Orientadora: Agueda Castagna de Vargas
Santa Maria, 18 de fevereiro 2009.

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial antimicrobiano do extrato de própolis, substância natural conhecida pelas suas propriedades terapêuticas, frente a 67 isolados microbianos da otite canina. A Concentração Bactericida Mínima (CBM), do extrato de própolis, frente a isolados de *Staphylococcus coagulase positiva* e a Concentração Fungicida Mínima (CFM) para isolados de *Malassezia pachydermatis* foram determinadas utilizando-se a técnica de microdiluição em caldo. A CBM foi de 15,1mg mL⁻¹, enquanto a CFM foi de 2,4mg mL⁻¹. Dessa forma foi demonstrado o potencial antimicrobiano do extrato de própolis testado contra esses dois agentes e a menor concentração bactericida e fungicida necessária para a inibição dos mesmos.

Palavras-chave: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, Leveduras e Fitoterápicos.

ABSTRACT

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária
Universidade Federal de Santa Maria, RS, Brasil

ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF PROPOLIS EXTRACT AGAINST STAPHYLOCOCCUS COAGULASE POSITIVE AND MALASSEZIA PACHYDERMATIS OF CANINE OTITIS

AUTHOR: Rosemari Laura Cardoso
ADVISER: Agueda Castagna de Vargas
Data and place of the defense: February, 18th, 2009
Santa Maria.

The purpose of this study was to evaluate the antimicrobial potential of the propolis extract, natural substance known for its therapeutic properties, against to 67 microbial isolates of canine otitis. The Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of the propolis extract against the isolates of coagulase-positive *Staphylococcus* and the Minimum Fungicide Concentration (CFM) for *Malassezia* sp. isolates were determined using the broth microdilution technique. The MBC was 15.1mg mL⁻¹, while the MFC was 2.4mg mL⁻¹. Thus was shown the antimicrobial potential of the propolis extract tested against these two agents and the lower bactericidal and fungicidal concentration needed for the inhibition of them.

Key Words: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, Yeasts and Phytotherapics.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 1 – Artigo

TABLE 01- Susceptibility of <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Staphylococcus intermedius</i> , and <i>Malassezia pachydermatis</i> to different própolis extract concentrations.....	32
--	----

LISTA DE APÊNDICES

APÊNDICE A - Isolados de <i>Staphylococcus</i> coagulase positiva testados.....	38
APÊNDICE B - Isolados de <i>Malassezia pachydermatis</i> testados.....	40

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1. Resistência Microbiana	12
2.2. Otites Canina	13
2.3. <i>Staphylococcus</i> sp.	16
2.4. <i>Malassezia</i> sp.	17
2.5. Própolis	20
3. CAPÍTULO 1	23
4. CONCLUSÕES	33
5. REFERÊNCIAS	34
APÊNDICE	38

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% = Porcentagem

µg = Micrograma.

et al. = Abreviação de et alii (masculino plural), et aliae (feminino plural), ou et alia (plural neutro).

in vitro. = Expressão latina que designa todos os fenômenos biológicos que têm lugar fora dos sistemas vivos, no ambiente controlado de um laboratório.

Kg = Quilograma.

mg = Miligrama.

mL-1 = Mililitro.

oC = Graus Celsius.

CIM = Concentração Inibitória Mínima

CBM= Concentração Bactericida Mínima

CFM= Concentração Fungicida Mínima

Nm = nanômetros

CLSI = Clinical and Laboratory Standards Institute

λ = comprimento de onda (lambda)

UFC = Unidades Formadoras de Colônias

1. INTRODUÇÃO

Conseqüentemente, a busca por terapias alternativas, é uma opção para combater a resistência de algumas cepas aos antimicrobianos. Uma substância muito conhecida e usada desde a antiguidade por sua ação antimicrobiana, dentre outras características, é a própolis. A própolis é elaborada pelas abelhas, composta por resinas de broto, fragmentos de tecido vegetal, enzimas salivares, cera, pólen e diversos materiais inorgânicos. É utilizada pelo homem desde a antiguidade por suas propriedades farmacêuticas e cosméticas (MOHAMMADZADEH et al.,2007). A sua composição é variável e está diretamente relacionada com a composição do broto da árvore de onde é coletada. As abelhas coletam de árvores como o álamo, videoeiro, castanheiras, amoreiras e várias outras plantas coníferas (BANKOVA DE CASTRO; MARCUCCI, 2000).

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana “in vitro” do extrato de própolis frente a dois agentes da otite canina, *Staphylococcus* coagulase positiva e *Malassezia pachydermatis* visando determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) e a Concentração Fungicida Mínima (CFM).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Resistência Microbiana

O uso indiscriminado dos antimicrobianos disseminou cepas resistentes entre as populações microbianas, impedindo a ação de diversos fármacos (TAVARES, 2000). Medidas e programas de prevenção e educação a clínicos,

farmacêuticos, veterinários, empresas do ramo de antimicrobianos e o público em geral, devem incluir a conscientização do impacto da resistência às drogas e a consequência desse fenômeno na saúde pública (BERGERON; OUELLETTE, 1998). A resistência das diversas espécies de organismos é extremamente variável entre os países, regiões e pode estar relacionada à origem hospitalar ou comunitária das cepas. Espécies bacterianas como o *Staphylococcus aureus* apresentam cepas resistentes difundida em todo o mundo (TAVARES, 2000).

Estudos sobre a resistência microbiana relatam outros fatores; desde antimicrobianos utilizados na alimentação animal, a exposição ambiental, e exposição direta aos animais, sendo os cães e os gatos potenciais fontes de disseminação de cepas resistentes às drogas pelo contato direto e estreito com seres humanos (GUARDABASSI et al.,2004).

Tanto nos animais como no ser humano o uso de antimicrobianos leva não somente a seleção de isolados bacterianos resistentes, mas também daquelas que constituem a microbiota endógena. Bactérias resistentes que colonizam animais podem infectar a população humana não somente pelo contato direto, mas também através de produtos de origem animal.

Estes organismos podem colonizar o homem e transferir seus genes de resistência a outros organismos da microbiota normal, apesar de não se definir claramente em qual extensão o uso de antimicrobianos em animais contribui para o problema de resistência na medicina humana, já existem evidências de que estas cepas podem circular do animal para o ser humano e para o ambiente (CIZMAN, 2003). Na medicina veterinária, as causas mais comuns de tratamento com antimicrobianos em cães e gatos são: feridas e infecções da pele, dermatites, infecções no trato respiratório, urinárias e gastrointestinais e a otite canina (GUARDABASSI et al.,2004).

2.2. Otites Canina

As otites caninas constituem um dos principais motivos de consultas a médicos veterinários; representam até 42% dos casos atendidos na clínica veterinária (RAMALHO et al., 2007), e a otite externa crônica corresponde a até

76% destes casos. A otite externa (OE) é muito comum, e o tratamento tem se tornado cada vez mais difícil na clínica médica de pequenos animais devido às altas taxas de recidiva. É uma afecção muito comum nesta espécie; ela produz efeitos de grande desconforto tanto para o paciente quanto para o proprietário, tais como vocalização, nervosismo, agitação, dor, prurido, secreção e odor.

A otite externa canina pode ser determinada por uma combinação de fatores predisponentes, primários e perpetuadores (AUGUST, 1988; LOGAS, 1994). Jacobson (2002) propôs a divisão desses fatores em: 1) Predisponentes - ou seja, aqueles que aumentam o risco de otite; 2) Primários - aqueles que causam otite diretamente; 3) Secundários - aqueles que contribuem para a ocorrência de otites apenas em orelhas anormais ou em conjunção com fatores predisponentes; e 4) Perpetuantes-que resultam da inflamação provocando mudanças patológicas da orelha que impedem a resolução da otite.

Fatores predisponentes de otite externa podem ser: a conformação das pinas, morfologia do conduto auditivo, maceração do epitélio, doenças sistêmicas, alterações climáticas e febre. Raças que possuem condutos tortuosos e/ou longo têm maior predisposição à doença devido a um ambiente mais favorável à instalação de fatores primários e perpetuantes. Fatores perpetuantes incluem infecção bacteriana e fúngica no conduto auditivo externo, alterações progressivas no conduto e presença de otite média. (LEITE et al. 2000). Conforme sejam atingidas as diferentes porções do ouvido, a otite se revestirá de maior ou menor gravidade, recebendo também denominações diversas, como otite externa (apenas ouvido externo inflamado), otite média (apenas ouvido médio inflamado), e otite interna. Esta é a forma mais grave, pois atingindo os canais semicirculares determinará transtornos do equilíbrio por ser este o órgão responsável pelo sentido espacial. Atingindo a cóclea, será a doença denominada labirintite, pois ser tal órgão é também chamado de labirinto (COLE et al., 1999).

A primeira fase da otite externa aguda causa uma inflamação do canal auditivo, com vários graus de eritema nas pinas, no meato externo e no forro externo do canal. Posteriormente outros sinais clínicos como agitação da cabeça, prurido, secreção, odor, e dermatite úmida perto da base da orelha. A inflamação também está associada com alterações hiperplásicas dos tecidos moles em torno

do meato acústico externo (ROSSER et al., 2004). Quando os problemas subjacentes não são identificados e tratados, essa otite aguda se torna crônica. Com a progressão da infecção, os tecidos moles podem desenvolver fibrose e os tecidos circundantes do canal externo do ouvido podem sofrer mineralização. Geralmente nesta fase o tratamento não apresenta efeito e apenas com intervenção cirúrgica pode-se tentar a resolução da infecção. Todo este processo pode resultar em erosões e ulcerações no revestimento do meato acústico externo, e invariavelmente aumentando a dor nos canais auditivos (ROSSER et al., 2004).

Ocorre também que exsudatos e infecções por microrganismos drenam do canal externo para o canal médio da orelha, causando erosões e rupturas dos tecidos ventrais da bula timpânica, levando a uma otite média. A patogenia da otite média canina é complexa e multifatorial. Um dos fatores como conformação do canal auditivo, tem como consequência inflamação com destruição do tecido e necrose do epitélio, isso devido à enzimas proteolíticas produzidas pelos exsudatos de uma otite externa mal tratada. Incidem ulcerações ao longo do canal auditivo que podem se estender ao tímpano.

Essa ulceração de tecido aumenta a formação de cerúmen pela escoriação do epitélio, e o equilíbrio dos microrganismos existentes no ouvido canino fica alterado (GOTTHELF, 2004). Na apresentação clínica, a otite canina externa pode ser classificada como aguda subaguda ou crônica. Vários processos patológicos podem ser os causadores de otite, com diferentes combinações de fatores primários, predisponentes e perpetuadores.

A infecção bacteriana secundária, a infecção leveduriforme, outras alterações patológicas crônicas e até mesmo a ruptura da membrana timpânica, juntamente com os erros durante o tratamento da otite média são fatores perpetuadores (LOGAS, 1994; LEITE, 2000). Vários estudos têm descrito a presença de microrganismos constituintes de uma microbiota normal no ouvido canino e têm demonstrado a associação entre *S. intermedius* e *M. pachydermatis* nos quadros de OE canina (NOBRE et al., 2001). Ocorre também a presença de bastonetes gram-negativos, mas o destaque é para os estafilococos coagulase positiva, principalmente o *S. intermedius* (LILENBAUM et al., 2000). A infecção

por bactérias e por leveduras é um fator primário da otite, por geralmente serem oportunistas e complicadores das mudanças iniciadas com os outros fatores primários (JACOBSON, 2002).

Em cerca de 30% dos casos de otite, isolou-se mais de um microrganismo. Pesquisas enfocaram o isolamento de microrganismos a partir de meato acústico de cães sadios (JUNCO; BARRASA, 2002) e otopatas (NOBRE et al., 2001). Sabe-se que a microbiota normal do conduto auditivo externo canino, constituída por *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp. e *M. pachydermatis*, altera-se em otopatas (AUGUST, 1993). No cão otopata, o *S. intermedius* é uma das principais bactérias isoladas (COLE et al., 1999; LILENBAUM et al., 2000).

2.3. *Staphylococcus* sp.

Staphylococcus sp. é um coco gram positivo com arranjos irregulares, conhecidos como “cachos de uva”. É anaeróbico facultativo (fermentativo), catalase positiva, oxidase negativa e imóvel. Cresce em ágar nutriente e em ágar sangue. Os mais patogênicos são os *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, e são todos coagulase positiva. Sendo que o teste de coagulase está correlacionado com a patogenicidade do agente (QUIIN, et. al., 1994).

As várias espécies do gênero *Staphylococcus* sp. são freqüentemente encontradas tanto em cães saudáveis como em doentes, podendo causar uma variedade de infecções, incluindo bacteremia, pneumonia, furúnculos, abscessos, piodermites, conjuntivite e otite externa. *S. intermedius* é coagulase positiva e é a espécie mais freqüentemente isolada em cães com otite (LILENBAUM et al., 2000). São também considerados patógenos primários de outras infecções em cães, como a piodermite. Algumas cepas produzem uma variedade de enzimas extracelulares e toxinas virulentas que, associadas, podem contribuir para a patogenicidade do microrganismo (SASAKI et al., 2005). Como infecções estafilocócicas são freqüentemente tratadas com antibióticos, a consequência é uma considerável resistência a estas drogas (HOEKSTRA ; PAULTON, 2002).

Há um potencial zoonótico apresentado por cepas de *S. intermedius*, mais comumente relacionado a lesões invasivas, como mordidas por cães ou cateteres

contaminados. Entretanto, é possível uma infecção não invasiva de *S. intermedius* de um cão contaminado para um ser humano, elevando ainda mais a importância de um tratamento eficaz dos cães com otite, especialmente daqueles em contato próximo com pessoas imunodeprimidas, muito jovens ou idosos (TANNER et al., 2000).

Pesquisas sobre a prevalência do *S. intermedius* em orelhas caninas, comprovaram que 4% das amostras foram positivas para essa bactéria nos Estados Unidos (PETERSEN et al., 2002) e no Japão o índice foi de 48,3% das amostras de secreção auricular (YAMASHITA et al. 2005). No Brasil, 25% dos casos de otite canina reportados na rotina da clínica têm como principal agente etiológico o *S. intermedius* (RAMALHO et al., 2007). Em outro estudo, 56% das amostras demonstraram resistência a mais de um antimicrobiano utilizado na clínica veterinária (OLIVEIRA et al., 2008).

Considerando-se os microrganismos potencialmente patogênicos, *S. intermedius* tem sido uma das principais espécies de cocos gram-positivos isolada em quadros de OE canina. Outras espécies de *Staphylococcus* também já foram descritas na literatura em quadros de OE canina, como o *S. aureus* subsp. *aureus*, *S. aureus* subsp. *anaerobius*, *S. hyicus*, e *S. schleiferi* subsp. *coagulans* (LILENBAUM et al., 2000; NOBRE et al., 2001 ; LEITE et al., 2003). Há um crescente interesse no estudo de *S. intermedius*, pelo fato de ser o principal agente de piodermite e um dos principais microrganismos relacionados à OE canina. Esta espécie foi primeiramente descrita em 1976 (VANDENESCH et al., 1995) na pele de cães. Estudos relataram a colonização de filhotes recém-nascidos pela referida espécie poucas horas após o nascimento (SAIJONMAA-KOULUMIES; LLOYD, 2002).

2.4. *Malassezia* sp.

Malassezia sp. é uma levedura zoofílica e lipofílica, porém não lipodependente, encontrada na superfície cutânea e conduto auditivo externo de mamíferos, sendo, ocasionalmente, isolada da pele sadia do homem. As leveduras do gênero *Malassezia* sp., pertencem à família *Cryptoocaceae*, ordem

Cryptococcales, classe de *Blastomycetes*, divisão *Deuteromycotina*. São leveduras com espessa membrana celular, com múltiplas camadas (NOBRE et al., 2001). *M. pachydermatis* é a única espécie lipofílica não dependente do gênero entre as outras sete espécies existentes (ZAITZ et al., 2000). Geralmente são microrganismos comensais e que habitam a pele de mamíferos e aves, inclusive o canal auditivo do cão. A primeira descrição como agente etiológico em dermatites foi realizada por DUFAIT em 1983.

Leveduras do gênero *Malassezia* são comumente relatadas como causa de enfermidades, denominadas malassezioses, em várias espécies animais e acometendo diferentes sítios anatômicos. Sua manifestação patogênica pode estar associada a modificações no ecossistema cutâneo ou a distúrbios nas barreiras química, física e imunológica do hospedeiro (GUILLOT; BOND, 1999). Essa levedura está presente entre 15 a 50% nos ouvidos de cães saudáveis e atinge níveis superiores a 83% em animais com otite (CRESPO et al., 2002).

Morfologicamente apresentam-se em um agrupado de células, com formato oval único ou com uma ponta mais estreita e com base ampla, adquirindo o formato de uma “garrafa”, hifas e pseudohifas são geralmente ausentes (NOBRE et al., 2001). Durante muitos anos o gênero *Malassezia* foi limitado a duas espécies, *M. furfur* (lipodependente) e *M. pachydermatis* (independe de lipídeos). Porém, com estudos genotípicos de diversas cepas, associados às características fenotípicas, permitiram a identificação de outras 10 espécies, baseadas em características moleculares, e todas dependentes de lipídio: *M. dermatis*, *M. equi*, *M. furfur*, *M. globosa*, *M. japonica*, *M. nana*, *M. obtusa*, *M. restricta*, *M. slooffiae*, *M. sympodialis* (CAFARCHIA et al., 2005).

A capacidade de *M. pachydermatis* em se reproduzir em ambientes livres de lipídeos é suficiente para sua identificação, sendo que os outros testes fisiológicos utilizados contribuem na caracterização fenotípica das demais cepas da espécie (CRESPO et al., 2002). Se um isolado de um espécime clínico suspeito de malasseziose crescer em ágar Sabourad simples, já pode ser identificado como *M. pachydermatis* (GUILLOT et al., 1996).

Entre os outros testes de diferenciação da *M. pachydermatis* das demais espécies, está o crescimento em temperaturas de 37 a 40 °C; assimilação de

Tween 20, 40, 60, 80; reação de catalase; teste da urease e hidrólise da esculina. Outras formas de diferenciação das espécies de *Malassezia* sp. incluem a forma de brotamento e o tipo de células leveduriformes. Assim, quando o brotamento é de base estreita e as células são ovóides ou cilíndricas, trata-se provavelmente de *M. furfur*. Se o brotamento for de base estreita e as células esféricas, pode-se tratar de *M. restricta* ou *M. globosa*.

Quando o brotamento é de base larga e as células são ovóides, pode-se tratar de *M. pachydermatis* ou *M. sympodialis*. Brotamento de base larga com células cilíndricas grandes indica *M. obtusa*, enquanto células cilíndricas pequenas podem corresponder à *M. slooffiae* (ZAITZ et al., 2000). A colonização por *M. pachydermatis* e a infecção bacteriana, são fatores que perpetuam as otites externas.

Devido às alterações provocadas por inflamação, esse agente que é oportunista, torna-se patogênico, multiplicando-se exageradamente, agravando o quadro de otite (ROSYCHUK et al., 1994). *M. pachydermatis* é o organismo mais encontrado nas amostras colhidas de ouvidos, até mesmo em cães saudáveis, por esse motivo foi reconhecido como um microrganismo oportunista (MASUDA et al., 2001). Esta levedura tem natureza oportunista, e pode tornar-se patogênica quando há uma alteração no ambiente microbiológico da superfície da pele ou na defesa do hospedeiro, produção excessiva de cerúmen no ouvido, alteração de pH, depois de terapia com antibiótico e em casos de alergia, levando a um aumento na colonização por *M. pachydermatis* (CRESPO et al., 2002; NOBRE et al., 2001; FARVER et al., 2005).

Assim, mesmo que *M. pachydermatis* seja parte da microbiota da pele canina, tem sido reconhecida como um patógeno secundário na pele de cães e gatos afetados por dermatite seborréica e otite externa ceruminosa (NARDONI et al., 2004). Esta espécie pode ter um papel importante nas dermatites crônicas e otite externa, especialmente em carnívoros. É a levedura que mais comumente contribui como um fator perpetuante para otite externa em cães e gatos (CRESPO et al., 2002).

As otites externas associadas à proliferação de *Malassezia* são bilaterais e apresentam uma forma eritemato-ceruminosa com prurido e, eventualmente, dor,

nas quais *M. pachydermatis* é o agente mais prevalente (NOBRE et al., 2001). Em cães, o tipo de orelha foi um fator predisponente importante para o crescimento da levedura, mais do que idade e sexo, provavelmente porque as orelhas pendulares criam um ambiente favorável para o crescimento desta levedura (CAFARCHIA et al., 2005). Estudos relatam que a densidade das glândulas apócrinas distribuídas no canal auditivo canino varia de raça para raça; observaram também, que embora a incidência de otite externa em cães se relacione com o formato da pina, ela depende preferencialmente da quantidade de lipídio secretado por essas glândulas. Também observaram que *M. pachydermatis* se multiplica na presença de ácidos graxos, embora esta espécie seja classificada como não dependente de lipídio. Este pode ser o mecanismo responsável pela maior ocorrência de otite nos animais que possuem orelhas pendulares, além do excesso de umidade presente neste tipo de orelha (MASUDA et al. 2000).

Malassezia sympodialis foi isolada da pele e canal auditivo de cães saudáveis e foi relatada como a espécie dependente de lipídio mais encontrada em gato saudável, ao contrário do que tem sido dito que espécies dependentes de lipídio são isoladas somente em ouvidos com otite externa. Os fatores responsáveis pela presença de espécies de *Malassezia* na pele dos diferentes hospedeiros não estão claramente entendidos, embora diferenças na composição lipídica da pele sejam sugeridas como um possível fator, como também ruptura do extrato córneo, aumento de umidade, seborréia e produção excessiva de cerúmen (NARDONI et al., 2004). No canal auditivo externo de gatos também foi encontrado *M. globosa* (CAFARCHIA et al., 2005).

2.5. Própolis

Etimologicamente, a palavra própolis, de origem grega, significa: pró = em defesa, e polis = cidade, evidenciando a sua importância para a colônia que a utiliza para vedar frestas, recobrir superfícies irregulares ou insetos e eventuais invasores que morrem no interior da colméia, com a finalidade de evitar sua decomposição. A própolis é um material resinoso, encontrado em tons que variam do amarelo-esverdeado, passando pelo marrom-avermelhado ao negro. É um

material elástico que pode distender-se em até 200% antes de romper-se, apresentando 1/11 da rigidez da cera (BANSKOTA et al., 2000).

Própolis é uma denominação genérica utilizada para descrever uma mistura complexa de substâncias resinosas, gomosas e balsâmicas colhidas por abelhas melíferas de brotos, flores e exsudatos de plantas, às quais as abelhas acrescentam secreções salivares, cera e pólen para a elaboração do produto final. Seu emprego na colméia está relacionado com suas propriedades mecânicas, sendo utilizada na construção, adaptação e proteção da colméia, e sua atividade antimicrobiana garante um ambiente asséptico (FUNARI; FERRO, 2006). A própolis apresenta aroma forte e característico, em consequência de uma fração volátil de ácidos fenólicos, forte propriedade adesiva e um conjunto complexo de substâncias (55% de resinas e bálsamos; 30% de ceras; 10% de óleos voláteis e cerca de 5% de pólen) (BURDOCK, 1998; BANSKOTA et al., 2000). O uso terapêutico da própolis possui uma longa história, desde 300 aC até os dias de hoje.

Outros fins terapêuticos da própolis, além da atividade antimicrobiana são as atividades antiinflamatórias, hepatoprotetora, antioxidante e outros efeitos biológicos sobre o sistema imune. Auxilia no combate a doenças causadas por bactérias, fungos, vírus e parasitas (KORU et al., 2007).

A ação antimicrobiana da própolis está relacionada à inibição da população bacteriana e da RNA-polimerase do microrganismo, juntamente com a desorganização do citoplasma e da membrana da bactéria (SANTOS et al., 2002). Takaisi-Kikuni e Schilcher (1994), por meio de micro-calorimetria e de microscopia eletrônica, utilizando *Streptococcus agalactiae*, demonstraram que a própolis inibiu o crescimento bacteriano por impedir a divisão celular, desorganizando o citoplasma, a membrana citoplasmática e a parede celular, causando uma lise bacteriana parcial e inibindo a síntese protéica. De acordo com os autores, ficou evidente que o mecanismo de ação da própolis sobre células bacterianas é complexo e que não pode ser feita uma simples analogia ao modo de ação de alguns antibióticos clássicos.

Estudos sugerem que a maioria das atividades biológicas e farmacológicas da própolis ocorre pela presença de um grande número de flavonóides, ácidos

aromáticos e compostos fenólicos (MOHAMMADZADEH et al., 2007), além de que a composição química da própolis distingue-se de região para região, e que a proporção dos tipos de substâncias encontradas são variáveis e dependentes do local de coleta, influenciando no tipo de ação farmacológica e toxicológica de uma amostra (MORENO et al., 2000; BANSKOTA et al., 2000).

De acordo com Marcucci 1995 a composição química de amostras procedentes da Europa, Ásia e América do Norte não foi muito variável, pois as fontes florais principais são algumas espécies de choupo, principalmente o preto (*Populus nigro*). Os mais importantes componentes dessas amostras de própolis foram os derivados fenólicos como ; flavonóides, ácidos aromáticos e seus ésteres (cerca de 50% do peso da própolis). Entretanto, a composição química e a origem das resinas da própolis da América do Sul são de especial interesse pela riqueza da flora, sendo que amostras da própolis oriundas do Brasil e da Venezuela confirmaram a presença de compostos incomuns onde os flavonóides, por exemplo, foram muito pouco observados, sendo mais comuns os ácidos fenólicos.

Moreno et al. (2000) compararam amostras de própolis de quatro localidades de Almaicha Del Valle (província de Tucumán) e de Cerrillo (província de Santiago de Estero), distintas regiões fitogeográficas da Argentina. A análise cromatográfica das amostras das regiões de Almaicha del Valle foram semelhantes entre si, mas diferiram da amostra de Cerrillo, indicando diferenças quanto composições das mesmas. Investigando a composição química da própolis brasileira de regiões diferentes, Marcucci (1999) encontrou vários compostos novos, como um derivado do ácido cumárico, que apresentou atividade antibacteriana e antitumoral. Estes compostos estão presentes em muitas amostras de regiões diferentes no Brasil, e sua fonte é o exsudato das folhas de algumas espécies de *Baccharis* spp. (vassourinha ou alecrim-do-campo). De acordo com o autor, isso demonstra a importância dos ácidos fenólicos para a padronização e controle de qualidade da própolis.

3. CAPÍTULO 1

Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus* coagulase-positive and *Malassezia pachydermatis* sp. of canine otitis

A ser submetido à revista Fitoterapia

Antimicrobial activity of propolis extract against *Staphylococcus coagulase positive* and *Malassezia pachydermatis* of canine otitis

Rosemari Laura Cardoso^I Agueda Castagna de Vargas^{II}

ABSTRACT

Research to identify alternative therapies for canine otitis is critical because it is a disease that exhibits a high level of antimicrobial resistance. The aims of this study therefore were to evaluate the antimicrobial potential of propolis extract by determining the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of coagulase-positive *Staphylococcus* isolates and the Minimum Fungicidal Concentration (MFC) of *Malassezia pachydermatis* isolates. The microorganisms were assayed using broth microdilution techniques. The propolis extract was found to exhibit satisfactory antimicrobial activity against both pathogens.

Key-words: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, Yeasts and Fitotherapics.

1. INTRODUCTION

Propolis is a natural compound well known since ancient times for its therapeutic effects; the substance can be used in the development of alternative therapies for the treatment of many diseases [1]. It is produced by bees from the resins of sprouts, exudate and other parts of plant tissues [2]. The biological and pharmacological activities, in particular the anti-microbial, anti-virus, anti-cancer, anti-inflammatory, and anti-oxidant effects [1], depend on the chemical

composition, which in turn depends on the geographic localization of the plants that the bees feed on. The most common compounds in propolis are flavonoids, aromatic acids, and phenolic esters [3].

In veterinary medicine, fungal and bacterial diseases can exhibit a high level antimicrobial resistance [4] and thus require alternative therapies. Included in this group of diseases is canine otitis, which is highly prevalent; 21.7 to 42% of dogs have been reported to be infected [5, 6].

Canine otitis is a disease resulting from some factors as: predisposing factors and the action of bacteria and fungi. This infection, normally, present a high level of microbial resistance [7]. The majority of dogs with otitis have a simultaneous infection with two etiological agents (*Staphylococcus intermedius* and *Malassezia pachydermatis*). Infection by only one of these pathogens is not common [6]. Both microorganisms belong to the normal microbial flora of the auricular area; they only become pathogenic when they multiply very fast.

The aims of this study were to evaluate the antimicrobial activity of propolis extract *in vitro* against coagulase-positive *Staphylococcus* and *Malassezia pachydermatis* isolates from dogs with otitis, with the aim of determining the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and the Minimum Fungicidal Concentration (MFC).

2. MATERIAL AND METHODS

2.1. Preparation of the propolis extract.

The propolis used in this work was obtained from Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil. The propolis was cold-macerated to make an extract with ethanol 70% (brute propolis 30% / ethyl alcohol 70%). The resulting solution was stored at room temperature and protected from light for 45 days, after which the supernatant was extracted using a siphon.

2.2. Microorganisms

Sixty-seven microbial isolates were used: 34 *Staphylococcus* coagulase-positive (*Staphylococcus intermedius* n= 25, *Staphylococcus aureus* n= 8, and, for control, one bacterial reference strain *S. aureus* ATCC 25923) and 33 *Malassezia pachydermatis* isolates. All of them originated from canine otitis, which was phenotypically identified according to QUINN et al. [8].

To obtain inocula, bacterial isolates were grown in ovine blood agar 5% and incubated at 35°C for 24 hours. The fungal isolates were grown in sabouraud agar under the same conditions.

2.3. Determination of the antimicrobial activity – Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC).

To evaluate the Minimum Bactericidal Concentration (MBC) and Minimum Fungicidal Concentration (MFC), propolis extract concentrations ranging from 42.8mg mL⁻¹ to 0.69mg mL⁻¹ were tested. Inocula were prepared with bacterial and fungal saline suspension, with a cell concentration between 0.40 and 0.49nm of absorbance for bacterial inoculum, and between 0.60 and 0.69nm for the *M. pachydermatis* inoculum. The spectrophotometer readings were taken at a wavelength of 600 nm; these procedures created suspensions with a concentration of approximately 1.0 x 10⁶ UFC/mL. The M7-A4 (National Committee for Clinical Laboratory Standards – NCCLS, 1997) and the NCCLS M27-A2 (2002) protocols [9, 10] were used to obtain the MBC and MFC, respectively. The innocuity of the 70% ethanol was evaluated by diluting it to 3% in Müller-Hinton broth. The controls for inoculum viability and growth medium sterility were performed according to the above protocols.

3. RESULTS AND DISCUSSION

The results obtained in tests of antimicrobial activity demonstrated the bacterial and fungal action of propolis extract; both coagulase-positive *Staphylococcus* and *Malassezia pachydermatis* isolates were found to be sensitive

to propolis extract. The alcohol control did not inhibit bacterial or fungal isolate growth.

Four of the seven tested concentrations were found to be more effective against coagulase-positive *Staphylococcus*, (see TABLE 1).

The *in vitro* antibacterial activity has previously been well demonstrated against a great variety of bacteria, particularly gram-positive species. Its action against *Staphylococcus* sp. has also been reported [11, 12, 13]. Miorin et al. [14] described Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) ranging from 126.23mg mL⁻¹ to 185.7mg mL⁻¹ for *S. aureus*, whereas Kujumgiev et al. [11] and Bankova et al. [15] demonstrated propolis activity at a concentration of 0.4mg mL⁻¹ against *S. aureus*. Studies with propolis produced by three different bee species showed variations at MIC ranging from 117 to 468µg mL⁻¹ against *S. aureus* isolates [16]. The majority of research addressing propolis antimicrobial activity has been performed in human medicine, using a wide range of techniques.

The results of our tests in *M. pachydermatis* isolates are described in TABLE 1, which confirms the antifungal activity of propolis; only a low extract concentration was required to inhibit these yeasts under *in vitro* growth conditions.

Studies performed with *Malassezia* species are less common, especially in animal samples. The fungistatic and fungicidal activities of propolis extract against *M. pachydermatis* were previously demonstrated by Lilenbaum and Barbosa [17], using the serial distribution method; these authors demonstrated activity over a range of 0.8mg mL⁻¹ to 2.4mg mL⁻¹, which represents concentrations similar to those tested in this study.

In human medicine, the antifungal activity of propolis has been previously reported in numerous yeast species. Longhini et al. [16], for example, demonstrated the antifungal potential of propolis extract at 0.4mg mL⁻¹. Kujumgiev et al. [11] showed the best inhibitory zone using 0.5mg mL⁻¹ of alcoholic propolis extract against yeasts. Tests performed by Silici et al. [18] with *Candida albicans* demonstrated an MIC of 3.7mg mL⁻¹. However, the lowest published concentration of propolis extract with demonstrable activity against filamentous fungi and yeast is 16µg mL⁻¹, which was obtained by Uzel et al. [13] against a reference strain

Candida tropicalis. Another study, using the clinically important fungus, *Cryptococcus neoformans*, yielded an MFC of 1.6mg mL^{-1} [19]. The differences observed between the results described in the literature and those in the current study can be attributed to the different types of yeasts originating from human samples, due to geographical variations or because of variations in the propolis extract preparations themselves. Thus, a number of variables must be considered in every propolis study.

MBC and MFC results using our propolis extract against coagulase-positive *Staphylococcus* and *Malassezia pachydermatis* demonstrated efficacy at concentrations less than 42.8mg mL^{-1} , demonstrating the antimicrobial potential of the propolis extract tested against both of these agents and the lower bacterial and fungal concentration for inhibit their growth.

REFERÊNCIAS

- [1] V. Bankova, Recent trends and important developments in propolis research, Evid. - based complem. alternat. Med 2005; 2: 29-32.
- [2] T. Kusumoto, T. Miyamoto, R. Higuchi, S. Doi, H. Sugimoto, H. Yamada, Isolation and structures of two new compounds from the essential oil of Brazilian propolis, Chem. Pharm. Bull 2001; 49:1207–1209.
- [3] W. Krol, Z. Czuba, T. Matsuno, G. Zydowicz, J. Shani, M. Mos, Inhibition of neutrophils chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components, J. Ethnopharmacol 1996; 55: 19-25.
- [4] K. Pedersen, K. Pedersen, H. Jensen, K. Finster, V.F. Jensen, O.E. Heuer, Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs, J. Antimicrob. Chemother 2007; 60:775–781.
- [5] L.C. Oliveira, A.M.S. Brilhante, C.B. Cunha, M. Carvalho, Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas, Arq. Bras. Med. Vet. Zootec 2006; 58: 1009-1017.

- [6] R.M. Ramalho, R. Grossi, J. L. Andriolli, R.A. Said, Características clínicas dos casos de otite externa em cães atendidos em Ilhéus/BA e sensibilidade antimicrobiana *in vitro* das bactérias isoladas. *Acta Scientiae Veterinariae* 2007; 35:423-424.
- [7] P. Lyskova, M. Vydrzalova, J. Mazurova, Identification and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria and Yeasts Isolated from Healthy Dogs and Dogs with Otitis Externa, *J. Vet. Med* 2007; 54: 559–563.
- [8] P.J. Quinn, M.E. Carter, B. Markey, G.R. Cartr. *Clinical Veterinary Microbiology*. Wolfe, 1994.
- [9] National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Approved standard, M7-A4. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standard, 1997. in R. Schwalbe, L.S. Moore, A.C. Goodwin, *Antimicrobial Susceptibility, is testing protocols*, CRC Press, New York, 2007; 6:91.
- [10] National Committee for Clinical Laboratory Standards – Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts. Approved standards, M27-A2. Wayne, Pa: National Committee for Clinical Laboratory Standard, 2002. , in R. Schwalbe, L.S. Moore, A.C. Goodwin, *Antimicrobial Susceptibility, testing protocols*, CRC Press, New York, 2007; 9:173.

- [11] A. Kujumgiev, I. Tsvetkova, Y. Serkedjieva, V. Bankova, R. Christov, S. Popov, Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. *J Ethnopharmacol* 1999; 64: 235 – 240.
- [12] P.L. Miorin, N.C. Levy Junior, A.R. Custodio, W.A. Bretz, M.C. Marcucci, Antibacterial activity of honey and própolis from *Apis mellifera* and *Tetragonisca angustula* against *Staphylococcus aureus*, *J. Appl. Microbiol* 2003; 95: 913- 920.
- [13] A. Uzel, K. Sorkun, Ö. Önçag, D. Çogulu, Ö. Gençay, B. Sali'h, Chemical compositions and antimicrobial activities of four different Anatolian propolis samples, *Microbiol. Res* 2005; 160:189-195.
- [14] A. Fernandes Júnior, E.C.D. Balestrin, M.L.R.S. Cunha, Atividade anti *Staphylococcus aureus* de extratos de própolis (EP) de *Apis mellifera* preparados com diferentes concentrações de etanol como extrato, *Rev. Ciênc. Farm* 2003; 24: 147–152.
- [15] V. Bankova, R. Christov, S. Popov, M.C. Marcucci, I. Tsvetkova, A.Kujumgiev, Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. *Fitoterapia* 1999; 70:190-193.
- [16] R. Longhini, S.M. Raksa, A.C.P. Oliveira, T.I.E. Svidzinski, S.L. Franco, Obtenção de extratos de própolis sob diferentes condições e avaliação de sua atividade antifúngica. *Rev. Bras. Farmacognosia* 2007; 17: 388-395.
- [17] W. Lilenbaum, A.V. Barbosa, Avaliação da atividade antimicrobiana da própolis perante *Malassezia pachydermatis in vitro*, *Rev. Bras. Med. Vet*, 1994; 16: 248-251.
- [18] S. Silici, S. Kutluca, Chemical composition and antibacterial activity of propolis collected by three different races of honeybees in the same region, *J. Ethnopharmacol* 2005; 99: 69-73.

[19] F.F. Fernandes, A.L.T. Dias, C.L. Ramos, M. Ikegaki, A.M. Siqueira, M.C. Franco. The *in vitro* Antifungal Activity Evaluatin of Propolis G12 Ethanol Extracton *Cryptococcus neoformans*, Rev. Inst. Med. Trop 2007; 49: 93-95.

Table 01 - Susceptibility of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Malassezia* sp. to different propolis extract concentrations.

Microorganisms	N (N° accumulated of strains responsive to propolis extract concentrations: (mg/mL ⁻¹))							*MBC/MFC
	0,6	1,3	2,6	5,3	10,7	21	42,8	
<i>S. aureus</i> (n=9)	0	0	0	2	3 (5)	3 (8)	1 (9)	13,3
<i>S. intermedius</i> (n=25)	0	0	0	2	16 (18)	7 (25)	0(25)	16
<i>Malassezia</i> (n=33)	5	1(6)	19(25)	8 (33)	0(33)	0(33)	0(33)	2,4

*Geometric Media of MBC: Minimum Bactericidal Concentration; MFC: Minimal Fungicidal Concentration

4. CONCLUSÕES

De acordo com os resultados in vitro obtidos neste trabalho é possível concluir que o extrato de própolis nas concentrações testadas, é capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Malassezia pachydermatis* oriundas de otite canina. Colaborando assim, com a diminuição da perpetuação desses agentes e do aumento da resistência dos mesmos aos antimicrobianos comerciais, com a vantagem de ser um produto natural, de baixo custo, livre de contra indicações e de doses tóxicas.

Conclui-se também que, a *Malassezia* sp. demonstrou maior susceptibilidade ao extrato de própolis que o *Staphylococcus* coagulase positiva. Assim, os resultados obtidos permitirão posterior realização de estudos quanto a utilização do extrato de própolis nessas concentrações in vivo em cães com diagnóstico clínico de otite canina.

5. REFERÊNCIAS

- AUGUST, J.R. Otitis externa: a disease of multifactorial etiology. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**. Philadelphia, v.18, n.4 p. 731-742, jul.1988.
- AUGUST, J.R. Otitis externa: una enfermedad de etiología multifactorial. **Veterinary Clinic of North American Small Animal Practice**. Philadelphia, v.18,n.4, p.1-14, jul.1993.
- BANKOVA, V.S.; DE CASTRO, S.L.; MARCUCCI, M. C. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. **Apidologie**.Versallies, v. 31, p.3–15,set, 2000.
- BANKOVA, V. et al. Recent trends and important developments in propolis research. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**.Sofia, v. 2.1 p. 29-32, fev.2005.
- BANSKOTA, A. et al. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. **Journal of Ethnopharmacology**, Amesterdam, v. 72, p. 239-246, set.2000.
- BERGERON, M.G.; OUELLETTE M. Preventing Antibiotic Resistance through Rapid Genotypic Identification of Bacteria and of Their Antibiotic Resistance Genes in the Clinical Microbiology Laboratory. **Journal of Clinical Microbiology**. Washington, v. 36, n.8, p. 2169–2172, ago.1998.
- BURDOCK, G.A. Review of the Biological Properties and Toxicity of Bee Propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**.Oxford, v. 36, n.4 p. 347-363, abr.1998.
- CAFARCHIA, C. et al. Occurrence and population size of *Malassezia* spp. in the external ear canal of dogs and cats both healthy and with otitis. **Mycopathologia**.Den Haag,v.160,n.2 p.143-149,set. 2005.
- CIZMAN, M. The use and resistance to antibiotics in the community. **International Journal of Antimicrobial Agents**. Birmingham . v. 21, n. 4, p. 297-307,abr. 2003.
- COLE, L.K. et al. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear canal and middle ear in dogs with otitis media. **Journal of the American Medical Association**. Chicago, v. 212, p. 534-538, fev.1998.
- CRESPO, M.J.; ABARCA, M.L.; CABAÑES, F.J. Occurrence of *Malassezia* spp. in horses and domestic ruminants. **Mycoses**. Berlim, v. 45, p. 333–337,mar.2002.
- DUFAIT, R. *Pityrosporum canis* as the cause of canine chronic dermatitis. **Veterinary Medicine and Small Animal Clinicia**. Edwardsville ,v. 78, p. 1055-1057, 1983.
- FUNARI, C.S.; FERRO, V.O. Análise de Própolis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. Campinas,v. 26, n. 1, p. 171-178, jan/mar.2006.

GOTTHELF, L.N. Diagnosis and treatment of otitis media in dogs and cats. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**. Pensilvânia, v. 34, n.2,p. 469–487, Mar.2004.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. London,v. 54, p. 321–332,ago. 2004.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**. Oxford, v. 37, p. 295-306, out.1999.

HOEKSTRA, K.A.; PAULTON, R.J.L. Clinical prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus aureus* and *Staph. intermedius* in dogs. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, n.3p. 406–413, ago.2002.

JACOBSON, L.S. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat. **Journal of the South African Veterinary Association**,Pretoria, v.73,n. 4, n. 73, p. 162-170, mar.2002.

JUNCO, M.T.T.; BARRASA, J.T.M. Identification and antimicrobial susceptibility of coagulase-positive *Staphylococci* isolated from healthy dogs and dogs suffering from otitis externa. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Tóquio, v. 49, p. 419-423, nov.2002.

KORU, O. Oral and dental bacteriology and infection In vitro antimicrobial activity of propolis samples from different geographical origins against certain oral pathogens. **Anaerobe**, Tóquio v. 13, p. 140–145, jun/ago.2007.

LEITE, C.A.L. **Entendendo a otite externa de cães e gatos: um guia prático para o profissional veterinário**. 2ªed. Universidade Federal de Lavras : Lavras, 2000, 40p.

LEITE, C.A.L; ABREU, V.L.V.; COSTA, G.M. Frequência de *Malassezia pachydermatis* em otite externa de cães. **Arquivo Brasileiro de Veterinária e Zootecnia**, Belo Horizonte, v. 55, n.1, p. 101-104, fev.2003.

LILENBAUM, W. et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* isolated from otitis externa in dogs. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 31,n.1 p. 42-45,jul. 2000.

LOGAS, D.B. Diseases of the ear canal. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**, Pensilvânia, v. 5, n. 24, p. 905, set. 1994.

MARCUCCI, M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. **Apidologie**. Versallies v. 26,n.2, p. 83-99, 1995.

MARCUCCI, M.C.; BANKOVA, V. Chemical composition, plant origin and biological activity of Brazilian propolis. **Current Topics in Phytochemistry**, v. 2, p. 115-123, 1999.

MASUDA, A. et al. Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. **The Journal of Veterinary Medical Science**, Osaka, v. 62, p.1177-1182, nov. 2000.

MOHAMMADZADEH, S. et al. Chemical composition, oral toxicity and antimicrobial activity of Iranian propolis. **Food Chemistry**, London v. 103, p. 1097–1103, out. 2007.

MORENO, M.I.N. et al. Comparison of the free radical scavenging activity of propolis from several regions of Argentina. **Journal of Ethnopharmacology**, Laussane, v. 71, n.1-2, p. 109-114, jul. 2000.

NARDONI, S. et al. Occurrence of *Malassezia* species in healthy and dermatologically diseased dogs. **Mycopathologia**, Den Haag, v.157, n.4, p. 383-388, maio.2004.

NOBRE, M.O. et al. Occurrence of *Malassezia Pachydermatis* and Other Infectious Agents as Cause of External Otitis in Dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 32, p. 245-249, set. 2001.

OLIVEIRA, L. et al. Comparative study of the microbial profile from bilateral canine otitis externa, **The Canadian Veterinary Journal**. Toronto, v. 49, p. 785-788, ago.2008.

PEDERSEN, K. et al. Occurrence of antimicrobial resistance in bacteria from diagnostic samples from dogs. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, Londres, v. 60, p. 775–781, jul.2007.

QUINN, P.J. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. Wolfe, 1994. 648p.

RAMALHO, R.M et al. Características clínicas dos casos de otite externa em cães atendidos em Ilhéus/BA e sensibilidade antimicrobiana in vitro das bactérias isoladas. **Acta Scientiae Veterinariae**, Porto Alegre, v. 35, n. 2, p. s423-s424, 2007.

ROSSER, E.J Jr. Causes of otitis externa. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**. Pensilvânia, v. 2, n. 34, p. 459-468, 2004.

ROSYCHUK, R.A.W. Management of otitis externa. **Veterinary Clinics of North American Small Animal Practice**. Pensilvânia, v. 24, n. 5, p. 921-951, 1994.

SAIJONMAA-KOULUMIES, L.E.; LLOYD, D.H. Colonization of neonatal puppies by *Staphylococcus intermedius*. **Veterinary Dermatology**, Oxford, v.13, n.3, p.123-130, jun.2002.

SANTOS, F.A. et al. Antibacterial activity of Brazilian propolis and fractions against oral anaerobic bacteria, **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.80, n.1, p.1–7, abr.2002.

SASAKI, A. et al. Characteristics of *Staphylococcus intermedius* isolates from diseased and healthy dogs. **Journal of Veterinary Medicine Science**, Toquio, v. 67, n.1, p.103-106, 2005.

TAKAISIKIKUNI, N.B.; SCHILCHER, H. Electron microscopic and microcalorimetric investigations of the possible mechanism of the antibacterial action of a defined propolis provanance. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 60, p. 222-227, 1994.

TANNER, M.A.; EVERETT, C.L.; YOUVAN, D.C. Molecular Phylogenetic Evidence for Noninvasive Zoonotic Transmission of *Staphylococcus intermedius* from a Canine Pet to a

Human. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 38, n. 4, p. 1628–1631, abr. 2000.

TAVARES, W. Problem gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Rio de Janeiro, v. 33, p. 281-301, maio/jun. 2000.

VANDENESCH, F. et al. Catheter-related bacteremia associated with coagulase-positive *Staphylococcus intermedius*. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington. v. 33, n.9, p. 2508–2510, set. 1995.

YAMASHITA, K. et al. Isolation and characterization of Staphylococci from externa auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. **Journal of Veterinary Medicine Science**, Tóquio, v. 67, n. 3, p. 263-268, mar. 2005.

ZAITZ, C.; RUIZ, L.R.B.; SOUZA, V.M. Dermatitis associated with yeasts from *Malassezia* genus. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 75, n. 2, p. 129-142, mar/abr. 2000.

APÊNDICE

Apêndice A- Isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva testados

<i>Staphylococcus</i> coagulase positiva						
Amostra	Coagulase	Hemólise	Espécie	OD	[] de Própolis %	[] de Própolis mg/mL ⁻¹
ATCC	+	+	<i>S. aureus</i>	0,43	1,5	21,4
10 E	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,41	1,5	21,4
10 D	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,41	1,5	21,4
12 D	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,46	1,5	21,4
31/91	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,47	1,5	21,4
33/95	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,45	0,75	10,7
66/91	-	+	<i>S. aureus</i>	0,45	1,5	21,4
76/91	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,45	1,5	21,4
81/91	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,49	0,375	5,3
83/90	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,47	1,5	21,4
83/94	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,45	1,5	21,4
85/90	+	+	<i>S. aureus</i>	0,48	0,75	10,7
93/94	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,43	0,375	5,3
94/94	-	+	<i>S. intermedius</i>	0,47	1,5	21,4
93/99	+	+	<i>S. aureus</i>	0,43	0,375	5,3
95/93	*	+	<i>S. aureus</i>	0,48	0,75	10,7
99/91	+	+	<i>S. aureus</i>	0,43	1,5	21,4
107/08	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,42	0,75	10,7
107/92	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,49	0,75	10,7
112/92	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,51	1,5	21,4
122/92	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,43	1,5	21,4
126/92	+	+	<i>S. aureus</i>	0,47	0,75	10,7

138/91	+	+	<i>S.intermedius</i>	0,43	1,5	21,4
151/91	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,45	1,5	21,4
178/90	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,41	1,5	21,4
189/99	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,41	0,75	10,7
196/90	+	+	<i>S. aureus</i>	0,46	0,375	5,3
197/94	+	+	<i>S. aureus</i>	0,45	3	42,8
201/90	-	+	<i>S. intermedius</i>	0,48	0,75	10,7
214/90	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,4	1,5	21,4
225/08	+	+	<i>S.intermedius</i>	0,43	0,75	10,7
227/92	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,43	1,5	21,4
255/90	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,44	0,75	10,7
261/90	+	+	<i>S. intermedius</i>	0,43	1,5	21,4

APÊNDICE B– Isolados de *Malassezia sp* testados

<i>Malassezia sp.</i>								
Amostra	OD	[] de Própolis %	[] de Própolis mg/mL ⁻¹	Urease	Morfologia em placa	Catalase	Hifas	Morfologia em lamina
3 A	0,66	0,375	5,357	-	Col. Claras Unidas e Brilhosas	+	-	Puntiforme globosa
04/07	0,67	0,04	0,669	-	Col. Claras Unidas e Brilhosas	+	-	Puntiforme globosa
07/08	0,6	0,18	2,67		Col. Claras Unidas e Brilhosas	+	-	Puntiforme globosa
08//08	0,65	0,04	0,669	-	Col. beges opacas, unidas	+	-	Puntiforme globosa
911/07	0,65	0,09	1,33	-	Col. Claras Uni e Brilhosas	+	-	Puntiforme globosa
09/08	0,69				Col. claras brilhosas	+		
11 ouvido direto/08	0,69	0,18	2,67	+	Col. Claras, brilhantes, aspecto oleoso	+	-	Puntiforme globosa
14/05	0,65	0,04	0,669	-	Col. Claras Uni e Brilhosas	+	-	Puntiforme globosa
18/08	0,66	0,04	0,669	-	Col. Beges secas e opacas, rugosas	+	*	Colônias hexagonais
20/08	0,68	0,18	2,67	+	Col. claras secas e opacas, rugosas	+	-	Puntiforme globosa
21/07	0,65	0,18	2,67	-	Col. Claras Uni e Brilhosas	+	-	Puntiforme globosa
22/08	0,63	0,18	2,67	+	Col. Beges secas e opacas, rugosas	+	+	

22/08-2	0,63	0,18	2,67		Col. Claras, brilhantes, aspecto oleoso	+	-	Puntiforme globosa
26/07	0,64	0,18	2,67	-	Col. Claras, brilhantes, aspecto oleoso	+	-	Puntiforme globosa
31/08	0,67	0,18	2,67	-	Col. Claras, brilhantes, aspecto oleoso	+	-	Puntiforme globosa
33/07	0,61	0,375	5,357		Col. Claras brilhosas	+	-	
35/08	0,65	0,04	0,69	-	Col. Claras, brilhantes, aspecto oleoso	+	-	Puntiforme globosa
37/07	0,69	0,18	2,67	-	Col. Claras Unidas e Brilhosas	+	-	Puntiforme globosa
38/08	0,68	0,18	2,67	-	Col claras secas	+	-	Puntiforme globosa
39/07	0,66	0,18	2,67	-	Col. Claras Brilhosas	+	-	
40/07	0,66	0,18	2,67	-	Col. Claras brilhosas	+	-	
41/07	0,69	0,18	2,67	-	Col. Claras brilhosas	+	-	
42ouvido direito/08	0,69	0,18	2,67	-	Col claras e oleosas	+	-	Puntiforme globosa
42/08	0,67	0,18	2,67	-	Col claras e oleosas	+	+	Puntiforme globosa
43/08	0,62	0,375	5,357	-	Col claras e oleosas	+	-	Puntiforme globosa-
44/08ouvido direito	0,68	0,375	5,357	-	Col claras e oleosas	+	*	Puntiforme globosa
44/08	0,65	0,18	2,67	-	Col claras e oleosas	+	*	Colônias hexagonais
225/08 OE	0,68	0,18	2,67	+	Col beges,secas opacas, unidas	+	-	Puntiforme globosa
225/08 OD	0,68	0,18	2,67	+	Col beges,secas opacas, unidas	+	-	Puntiforme globosa

229/07	0,63	0,09	1,33	-	Col claras e oleosas	+	-	Puntiforme globosa
232/07	0,63	0,375	5,357	-	Col claras e oleosas	+	-	Puntiforme globosa
233/07	0,63	0,375	5,357	-	Col claras e oleosas	+	-	Puntiforme globosa
299/0,67	0,67	0,18	2,67	-	Col claras e oleosas	+	-	Puntiforme globosa

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.