



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DO
SEMIÁRIDO**

Juscilene Bagagi Moura

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DO EXTRATO ORGÂNICO DE
Cladonia substellata Vainio E DO ÁCIDO ÚSNICO FRENTE
Staphylococcus spp. E *Microsporum* spp. OBTIDOS DE CÃES E
GATOS**

PETROLINA – PE
2013

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DO
SEMIÁRIDO**

Jusciêne Bagagi Moura

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DO EXTRATO ORGÂNICO DE
Cladonia substellata Vainio E DO ÁCIDO ÚSNICO FRENTE
Staphylococcus spp. E *Microsporum* spp. OBTIDOS DE CÃES E
GATOS**

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Petrolina, como requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Semiárido.

Orientador: Prof. Dr. Mateus MatiuZZi da Costa

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Eugênia Cristina Gonçalves Pereira

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DO
SEMIÁRIDO**

FOLHA DE APROVAÇÃO

Jusciêne Bagagi Moura

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DO EXTRATO ORGÂNICO DE
Cladonia substellata Vainio E DO ÁCIDO ÚSNICO FRENTE
Staphylococcus spp. E *Microsporium* spp. OBTIDOS DE CÃES E
GATOS**

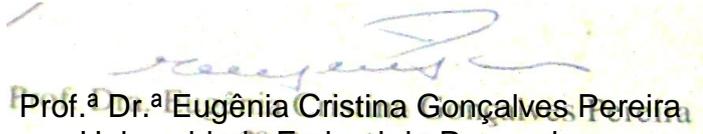
Dissertação apresentada como requisito para obtenção do título de Mestre em Recursos Naturais do Semiárido, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.



Prof. Dr. Mateus Matiuzzi da Costa
Orientador (UNIVASF)



Prof.ª Dr.ª Sônia de Avila Botton
Universidade Federal de Santa Maria



Prof.ª Dr.ª Eugênia Cristina Gonçalves Pereira
Universidade Federal de Pernambuco

Petrolina, 16 de julho de 2013.

Ao meu esposo, amigos, professores e colegas,
que de alguma forma participaram da
realização deste trabalho.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, que me permitiu esta oportunidade, sempre se fazendo presente na minha vida.

À minha família, e em especial ao meu esposo Hugo Leonardo Coelho Ribeiro, na qual tenho o enorme prazer em compartilhar minha vida e minhas conquistas, sempre contando com o seu apoio diante das mais variadas situações.

Ao meu orientador, Prof. Mateus Matiuzzi da Costa, por toda a generosidade e acolhimento, no qual, o respeito e a admiração que tenho por ele, me levaram a execução e conclusão deste trabalho.

Aos 54 companheiros do laboratório de microbiologia e imunologia animal, que me ajudaram a ser mais paciente e bem humorada, que de alguma forma compartilharam as alegrias e frustrações durante o desenvolvimento dos trabalhos laboratoriais, e que tornaram a caminhada mais leve, em especial: Ceiça, Carina, Milka, Márcia, Rodolfo, Luciana, Renatinha, Naedja, Renilde, Gisele, Evandro, Alan, Gilvan, Izabela, Jamille, Jarbas, Jennifer, Samily, Samira, Taty, Mariele, Carolina, Alessandra, Dielson, Weligton, Eugênio, Rafael e Chirles. Meu muito obrigado a todos!!!

Aos amigos Keidylania, Alane, Valéria, Thayana, Thais, Sabrina, Dielson, Ana Izabel, Grace e Maria Alice pelo apoio direto e incentivo durante esta etapa.

Aos colegas de mestrado Juliana Cabral, Camila, Fernanda, Ane, Ana Claudia, Tâmara, Edja, Anilson, Roniere, Raquel, Stefania, Martha e aos demais que compartilharam, somaram e dividiram seus conhecimentos, dando incentivo nessa caminhada.

Ao coordenador do Programa, Prof. Jackson Guedes, pela competência, compreensão e desenvoltura, ao qual tenho muita admiração.

Aos professores ligados ao Programa de Mestrado em RNSA, pela dedicação, coragem e apoio que deram aos alunos, em especial a Prof. Cheila Bedor, que despertou em mim a vontade de lecionar, usando uma metodologia excepcional em suas aulas.

Às clínicas veterinárias: Clivesf e Clínica Vida, em especial, ao veterinário Juracy Coelho Ramos Júnior, no qual o apoio foi imprescindível para a realização deste trabalho, um colega e amigo muito especial no qual sempre posso contar com seu apoio, e também aos estagiários Nádia e Wilson, pelo apoio e participação.

Ao HOVET-UNIVASF, que também me apoiou na realização deste trabalho, em especial a veterinária Regina Wolf Queiroz e à Professora Ana Amélia Domingues Gomes.

Em especial, ao Prof.^o Dr.^o João Gouveia, Prof.^a Dr.^a Eugênia Cristina Gonçalves Pereira e Dr.^a Gisele Veneroni, pela cooperação imprescindível na realização deste trabalho. Obrigada de coração!

À Capes pela concessão da bolsa de pós-graduação.

E a todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

"O que a vida quer da gente é coragem"

Guimarães Rosa

RESUMO

A dermatologia e a otologia veterinária são responsáveis por mais de um terço dos atendimentos na clínica de pequenos animais, onde os antimicrobianos e antifúngicos podem ser utilizados no tratamento dessas enfermidades. A utilização indiscriminada destes, e a emergência de cepas de micro-organismos resistentes têm sido uma preocupação mundial. A possibilidade de descoberta de novos fármacos na vegetação da caatinga brasileira, que ainda é pouco explorada, tem estimulado o estudo desses recursos. *Cladonia substellata* Vainio é um líquen encontrado em diversos continentes do mundo, inclusive no nordeste do Brasil, e possui vários metabólitos secundários com atividade biológica, entre eles, o ácido úsnico. O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado. Para isto, foram isolados *Staphylococcus* spp. de amostras de pele e orelha de cães e gatos com suspeita de piodermatite e otite, assim como *Microsporum* spp. e *Tricophyton* sp. de amostras de pele de cães e gatos com suspeita de dermatofitose. No teste de sensibilidade aos antimicrobianos frente *Staphylococcus* spp., 77% (105/136) foram resistentes. Na avaliação da produção de biofilme bacteriano, 83% (113/136) foram classificadas como produtoras de biofilme. Na caracterização genotípica, 32% (44/136) dos isolados bacterianos foram positivos para o gene *blaZ*; nenhum isolado (n=136) foi positivo para o gene *mecA* e 2% (3/136) foram positivos para o gene *icaD*. Na determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado, foi encontrado para *Staphylococcus* spp., uma faixa de inibição que variou de 0,25mg/ml a 0,0019mg/ml, e para *Microsporum* spp. a faixa de inibição de 0,1953mg/ml a 0,09765mg/ml. Pôde-se observar que tanto o extrato orgânico, quanto o ácido úsnico, inibiram o crescimento bacteriano e fúngico em baixas concentrações, e foram mais eficazes contra as bactérias produtoras de biofilme (0,65mg/ml–0,42mg/ml) quando comparadas às não produtoras de biofilme (2,52mg/ml-2,71mg/ml). Viabilizando a utilização do ácido úsnico e do extrato orgânico de *C. substellata*, no tratamento de otite, piodermatite e dermatofitose em cães e gatos.

Palavras chave: antibacteriana, bactérias, biofilme, dermatófitos, genes, resistência.

ABSTRACT

The veterinary dermatology and otology are responsible for over a third of clinical cases in small animals where antimicrobials and antifungals can be used in the treatment of these diseases. The indiscriminate use of these, and the emergence of strains resistant microorganisms have been a global concern. The possibility of drug discovery in the Brazilian savanna vegetation, which is not explored, has stimulated the study of these resources. *Cladonia substellata* Vainio is a lichen found in different continents of the world, including in the northeast of Brazil, and has several secondary metabolites with biological activity, including, usnic acid. The aim of this study was to evaluate the in vitro antimicrobial activity of the organic extract of *C. substellata* usnic acid and purified. To this were isolated *Staphylococcus* spp. samples of skin and ear of dogs and cats with suspected pyoderma and otitis, as *Microsporum* spp. and *Trichophyton* sp. skin samples from dogs and cats with suspected dermatophytosis. In the test antimicrobial susceptibility front *Staphylococcus* spp., 77% (105/136) were resistant. Measuring the output of bacterial biofilms, 83% (113/136) were classified as producing biofilm. In genotypic characterization, 32% (44/136) of the isolates were positive for the gene *blaZ*, none alone (n = 136) were positive for the *mecA* gene and 2% (3/136) were positive for the gene *icaD*. In determining the in vitro antimicrobial activity of the organic extract of *C. substellata* and purified usnic acid, was found to *Staphylococcus* spp. the range of inhibition ranged from 0,2mg/ml to 0,0019mg/ml, and *Microsporum* spp. Band inhibition 0,1953mg/ml to 0,09765mg/ml. It was observed that both the organic extract, the usnic acid inhibited bacterial and fungal growth in low concentrations, and were more effective against biofilm producing bacteria (0,65mg/ml-0,42mg/ml) compared not producing the biofilm (2,52mg/ml-2,71mg/ml). Enabling the use of usnic acid and the organic extract of *C. substellata* in the treatment of otitis, pyoderma and dermatophytosis in dogs and cats.

Keywords: antibacterial, bacteria, biofilm, dermatophytes, genes, resistance.

LISTA DE FIGURAS

| | | Pág. |
|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Figura 1 | <i>Cladonia substellata</i> Vainio (Fotos cedidas pela Prof ^a . Dr. ^a Eugênia Cristina Gonçalves Pereira – UFPE/2013). | 34 |
| Figura 2 | <i>Cladonia substellata</i> Vainio (Fotos cedidas pela Prof ^a . Dr. ^a Eugênia Cristina Gonçalves Pereira – UFPE/2013). | 34 |
| Figura 3 | Modelo estrutural do ácido úsnico (PEREIRA, 1998). | 35 |
| Figura 4 | Ocorrência de raças caninas com suspeita clínica de piodermatite e otite atendidos na cidade de Petrolina (PE), 2011-2012. | 50 |
| Figura 5 | Distribuição por idade dos 110 casos de otite e piodermatite em cães e gatos atendidos em Petrolina (PE) – 2011/2012. | 51 |
| Figura 6 | Identificação de <i>Staphylococcus</i> spp. utilizando os testes bioquímicos: Manitol Salt Agar (MSS), Glicose Salt Ágar (GSS), Púrpura Ágar Base (PAB), Urease e Dnase. | 52 |
| Figura 7 | Eficiência dos antimicrobianos testados frente aos 136 isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. | 54 |
| Figura 8 | Distribuição da presença do gene <i>blaZ</i> (44/136) nas espécies de <i>Staphylococcus</i> spp. isoladas de cães e gatos com suspeita clínica de piodermatite e otite no estado de Pernambuco e Rio Grande do Sul, 1990-2012. | 56 |
| Figura 9 | Comparação do efeito antimicrobiano do extrato orgânico da <i>Cladonia substelatta</i> Vainio e do ácido úsnico purificado, nas diferentes concentrações (mg/ml) utilizadas para determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), de acordo com o teste estatístico de Wilcoxon (SAMPAIO, 2007). | 61 |
| Figura 10 | Distribuição dos 40 fungos filamentosos isolados das 85 amostras de pelo de lesões de pele suspeitas de dermatofitose em cães e gatos, Petrolina (PE), 2011-2012. | 66 |

LISTA DE TABELAS

| | | Pág. |
|-----------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| Tabela 1 | Resenha dos isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. obtidos de piodermatite e otite em cães e gatos nos estados de Pernambuco (PE) e Rio Grande do Sul (RS). | 38 |
| Tabela 2 | Amostras de pelo (n=85) da borda de lesões de pele oriundas de cães e gatos com suspeita clínica de dermatofitose na cidade de Petrolina (PE). | 47 |
| Tabela 3 | Interação do extrato orgânico de <i>Cladonia substellata</i> Vainio e do ácido úsnico purificado, com o biofilme em formação e já consolidado dos <i>Staphylococcus</i> spp. avaliados, ambos na concentração de 0,25mg/ml. | 63 |
| Tabela 4 | Média da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato orgânico de <i>Cladonia substellata</i> Vainio e do ácido úsnico purificado, sob <i>Staphylococcus</i> spp. produtores de biofilme (19 isolados) e <i>Staphylococcus</i> spp. não produtores de biofilme (23 isolados) em microplacas de poliestileno com 96 poços. | 64 |
| Tabela 5 | Relação entre os resultados do exame microscópico direto e cultivo fúngico na identificação de dermatófitos, de amostras de pelo de cães e gatos com suspeita clínica de dermatofitose em Petrolina (PE), 2011-2012. | 68 |
| Tabela 6 | Susceptibilidade antifúngica de isolados de <i>Microsporum</i> spp. ao extrato orgânico de <i>Cladonia substellata</i> Vainio e ao ácido úsnico purificado. | 69 |

SUMÁRIO

| | Pág. |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------|------|
| 1. INTRODUÇÃO | 15 |
| 1.2. OBJETIVOS | 17 |
| 1.2.1. Objetivo geral | 17 |
| 1.2.2. Objetivos específicos | 17 |
| 2. REVISÃO DE LITERATURA | 19 |
| 2.1. Piodermatite | 19 |
| 2.2. Otite | 21 |
| 2.3. <i>Staphylococcus</i> spp. | 22 |
| 2.4. Resistência microbiana | 24 |
| 2.5. Formação de biofilme bacteriano | 26 |
| 2.6. Dermatofitose | 28 |
| 2.7. Alternativas antimicrobianas | 32 |
| 2.8. <i>Cladonia substellata</i> Vainio | 33 |
| 2.9. Ácido úsnico | 34 |
| 3. MATERIAIS E MÉTODOS | 38 |
| 3.1. Isolados bacterianos | 38 |
| 3.2. Material Liquênico | 39 |
| 3.3. Preparação do extrato orgânico de <i>Cladonia substellata</i> Vainio e isolamento do ácido úsnico | 39 |
| 3.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD) | 40 |
| 3.5. Identificação bacteriana | 40 |
| 3.5.1. Identificação morfológica e bioquímica | 40 |
| 3.5.2. Identificação molecular | 40 |
| 3.6. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos | 42 |
| 3.6.1. Teste fenotípico | 42 |
| 3.6.2. Teste genótipo | 43 |
| 3.7. Caracterização da produção de biofilme em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. | 44 |
| 3.7.1. Caracterização fenotípica da produção de biofilme bacteriano. | 44 |
| 3.7.2. Caracterização genotípica da produção de biofilme bacteriano. | 45 |

| | |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------|
| 3.8. Determinação da atividade antibacteriana do extrato orgânico de <i>C. substellata</i> e do ácido úsnico frente <i>Staphylococcus</i> spp. | 45 |
| 3.9. Interação do extrato orgânico de <i>C. substellata</i> e do ácido úsnico purificado com o biofilme consolidado. | 46 |
| 3.10. Interação do extrato orgânico de <i>C. substellata</i> e do ácido úsnico purificado com o biofilme bacteriano em formação. | 46 |
| 3.11. Identificação fúngica | 47 |
| 3.12. Determinação da atividade antifúngica frente ao extrato orgânico de <i>C. substellata</i> e ao ácido úsnico purificado. | 48 |
| 3.13. Análise estatística | 49 |
| 4. RESULTADO E DISCUSSÃO | 50 |
| 4.1. Origem das amostras | 50 |
| 4.2. Identificação bacteriana | 52 |
| 4.3. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos | 54 |
| 4.3.1. Teste fenotípico | 54 |
| 4.3.2. Teste genotípico | 55 |
| 4.4. Caracterização da produção de biofilme em isolados de <i>Staphylococcus</i> spp. | 59 |
| 4.4.1. Caracterização fenotípica da produção de biofilme bacteriano | 59 |
| 4.4.2. Caracterização genotípica da produção de biofilme bacteriano | 60 |
| 4.5. Determinação da atividade antibacteriana do extrato orgânico de <i>C. substellata</i> e do ácido úsnico purificado | 60 |
| 4.6. Interação do extrato orgânico de <i>Cladonia substellata</i> e do ácido úsnico purificado com o biofilme de <i>Staphylococcus</i> spp. consolidado e em formação e a sua relação com a MIC e CBM | 63 |
| 4.7. Identificação fúngica | 65 |
| 4.8. Determinação da atividade antifúngica do extrato orgânico de <i>C. substellata</i> e do ácido úsnico purificado | 69 |

| | |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 5. CONCLUSÃO | 71 |
| 6. REFERÊNCIAS | 72 |
| 7. ANEXOS | 89 |
| 7.1. Versão impressa em “pdf” do artigo submetido à revista Veterinary Microbiology, intitulado: “Antimicrobial action of <i>Cladonia substellata</i> Vainio extract and usnic acido on <i>Staphylococcus</i> spp. obtained from cats and dogs.” | |
| 7.2. Versão impressa em “pdf” da carta de aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UNIVASF. | |

1. INTRODUÇÃO

Na medicina veterinária, a dermatologia e a otologia veterinária são responsáveis por mais de um terço dos atendimentos na clínica de pequenos animais (CARDOSO et al., 2011; SOUZA et al., 2006; SCOTT et al., 2001) e reúnem fatores que podem estar envolvidos direta ou indiretamente, e concomitantemente com outras enfermidades, sejam de ordem imunológica, sistêmica, nutricional, endócrina, alérgica (tópica, DAP, alimentar), neoplásica, parasitária ou infecciosa.

O tratamento de piodermatites e infecções otológicas com antimicrobianos tem a finalidade de reduzir o número de bactérias, tornando a defesa do hospedeiro eficaz, pela administração de doses adequadas, de maneira que os micro-organismos sejam mortos ou inibidos (FOSSUM, 2001). Já que na maioria das enfermidades dermatológicas e otológicas tem-se o envolvimento bacteriano, seja como causa primária ou secundária, o que requer um longo período de tratamento (dias a meses), favorecendo a resistência bacteriana através da seleção natural (DONLAN, 2001; CIZMAN, 2003). Além disso, outros fatores de resistência, como a ocorrência de infecções reincidivantes associadas com a produção de biofilme bacteriano, impede a ação dos antimicrobianos, por torná-las resistentes às alterações de pH e temperatura (DONLAN, 2001; CIZMAN, 2003; COELHO et al., 2007).

Outra enfermidade que merece destaque na área dermatológica, é a dermatofitose. Nos cães e gatos constituem uma zoonose importante, pelo contato direto, principalmente com as crianças que são susceptíveis a esta enfermidade (WILLEMSE, 1998; MÜLLER et al., 1996; COSTA et al., 1994). Embora existam vários fármacos com ação antifúngica, estes são muito restritos, ao se comparar com o total de fármacos antibacterianos disponíveis, especialmente pela ocorrência de efeitos colaterais importantes (tóxicos) (NOBRE et al., 2002; LACAZ; NEGRO, 1991). Devido a isso há a necessidade da pesquisa de novos princípios farmacológicos que produzam menos efeitos colaterais.

A utilização indiscriminada de antimicrobianos, subdosagem medicamentosa, desrespeito aos períodos de tratamento, e a utilização empírica e desnecessária de antimicrobianos, tanto na área clínica médica veterinária como na medicina humana, tem contribuído para a seleção natural de micro-organismos resistentes em uma rápida velocidade. Neste sentido, ressalta-se *Staphylococcus* spp. resistentes à

metilina (MRS), associado às infecções hospitalares em todo o mundo (FAVRE et al., 2001). O controle de patógenos resistentes às terapias convencionais merece destaque no tratamento de enfermidades na área de saúde pública, englobando, neste contexto, a saúde animal. Desta forma, há a necessidade da busca por novos fármacos ou coadjuvantes no tratamento de enfermidades causadas pelos micro-organismos.

A Caatinga, um bioma do semiárido nordestino brasileiro, possui uma grande biodiversidade de fauna e flora, apesar de possuir apenas 1% de seu território atualmente conservado, especialmente pela conversão de áreas para agricultura e plantio de pastagens. As previsões climáticas prevêm aumentos de aridez, o que pode representar uma ameaça adicional à biodiversidade desse bioma (OLIVEIRA et al., 2012). Por isso, há a necessidade de maiores esforços na identificação de espécies da vegetação da caatinga, assim como a identificação farmacológica e atividade biológica de princípios ativos que possam ser isolados de indivíduos da flora nativa ou de áreas de transição com outros ecossistemas brasileiros.

O ácido úsnico, isolado do líquen *Cladonia substellata* Vainio, é um derivado do dibenzofurano, e tem apresentado uma vasta gama de atividades biológicas, entre elas: atividade antimicrobiana, antifúngica, antineoplásica, antiviral, antipirética, anti-inflamatória, analgésica, antiprotozoários, inseticida, hidratante, anti-histamínica e com atuação na proteção de efeitos nocivos dos raios ultra violeta (UV) (FOURNET et al., 1997; COCHIETTO et al., 2002; INGÓLFSDÓTTIR, 2002; FALCÃO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2006; HONDA et al., 2010). Embora tenha se mostrado hepatotóxico quando da sua utilização por via sistêmica em humanos, a sua utilização tópica já ocorre para fins medicinais, produtos de perfumaria e aplicações ecológicas, com formulações em creme, pasta de dente, antiséptico bucal, desodorantes e produtos de proteção solar (como princípio ativo ou conservante) (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Dando indícios da sua promissora utilização na área dermatológica animal, seja na utilização do extrato bruto orgânico de *C. substellata* ou do ácido úsnico purificado, que é encontrado em grande quantidade nessa espécie e tem demonstrado ser o responsável pela maioria das atividades biológicas apresentadas.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado sobre *Staphylococcus* spp. e *Microsporum* spp. obtidos de amostras de pele e orelha de cães e gatos com piodermatite, otite e dermatofitose.

1.2.2 Objetivos específicos

- ✓ Identificar (fenotípica e genotipicamente) os *Staphylococcus* spp. obtidos de amostras de pele e orelha externa de cães e gatos atendidos na cidade de Petrolina e advindos do laboratório de bacteriologia (LABAC) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria;
- ✓ Identificar os dermatófitos obtidos de amostras de pele de cães e gatos com suspeita de dermatofitose atendidos na cidade de Petrolina;
- ✓ Verificar e caracterizar a produção de biofilme nos isolados bacterianos;
- ✓ Identificar a presença dos genes *mecA*, *blaZ* e *icaD* nos isolados bacterianos;
- ✓ Determinar o perfil de sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus* spp. frente aos antimicrobianos convencionais;
- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado;
- ✓ Determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração fúngica mínima (CFM) do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado;
- ✓ Avaliar a interação do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado com a formação do biofilme e do biofilme consolidado,

produzido por isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de amostras de orelha e pele de cães e gatos com suspeita de otite e piodermatite.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Piodermatite

Dentre as especialidades veterinárias que atualmente se destacam está à dermatologia. Cerca de 20% a 75% dos atendimentos veterinários realizados em clínicas e hospitais veterinários estão relacionados com enfermidades dermatológicas (SCOTT et al., 2001; CARDOSO et al., 2011). Isso se deve principalmente ao fato de que alterações de pele chamam a atenção dos proprietários, fazendo com que se procure auxílio veterinário (SOUZA et al., 2006; HIL et al., 2006). A dermatite atópica (DA) afeta cerca de 10% da população canina em todo o mundo (HILLIER; GRIFFIN, 2001; SCOTT et al., 2001). As principais doenças da pele de cães e gatos em ordem decrescente de ocorrência são: bacterianas, parasitárias e fúngicas (MENESES et al., 2000; CARDOSO et al., 2011), sendo que as doenças bacterianas da pele em cães estão entre as mais frequentes (MENESES et al., 2000; CARDOSO et al., 2011; MULLER et al., 1986).

A microbiota natural da pele é constituída por bactérias residentes, transitórias e fungos. Nos cães, os gêneros ou espécies bacterianas residentes encontradas são *Micrococcus* spp., *S. pseudintermedius*, *Streptococcus* β -hemolítico, *Acinetobacter* spp., *Clostridium* spp. e *Propionibacterium acnes*. As bactérias transitórias incluem *Corynebacterium* spp., *Escherichia coli*, *Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp. e *Proteus mirabilis* (KAHN; LINE, 2010; SCOTT et al., 2001), sendo que as taxas de colonização de *S. pseudintermedius* é elevada (HANSELMAN et al., 2009). Nos gatos a microbiota residente inclui: *Micrococcus* spp.; estafilococos, especialmente *S. aureus* e *S. pseudintermedius* (SCOTT et al., 2001). Em um estudo realizado por Sasaki et al. (2005) sobre a produção de enterotoxinas por cepas de *S. intermedius* isoladas de cães doentes e saudáveis, eles verificaram que a produção destas foi significativamente maior em cães doentes do que em cães saudáveis, demonstrando o seu envolvimento na patogenicidade do acometimento da pele por estas bactérias.

Com relação às causas infecciosas, a piodermite bacteriana causada por *S. pseudintermedius*, e outros agentes como *S. aureus* e *S. schleiferi* são mais comumente relatadas (HUERTA et al., 2011), sendo que sua frequência varia de 75,7% à 91,6% nesta espécie. Há um consenso entre grande parte dos autores, que consagra *S. pseudintermedius*, antes classificado como *S. intermedius*, como o mais

importante patógeno nas piодermite superficiais em cães (CARLOTTI et al., 1995; NELSON; COUTO, 2001; HILL et al., 2006; HAUSCHILD; WÓJCIK, 2007; BANNOEHR et al., 2007).

A piодermatite em cães é mais comum do que em gatos, devido à baixa capacidade de aderência desses micro-organismos aos corneócitos dos felinos (WOOLLEY et al., 2008). No diagnóstico de piодermite deve-se primeiro excluir a demodicose, malasseziose, dermatofitose e outras causas de foliculite (LOEFFLER et al., 2007). Em cães fundamenta-se em sinais clínicos sugestivos como: prurido, secreção purulenta, perda de pelo, em combinação, com achados citológicos compatíveis com a infecção bacteriana. Como exemplo a presença de bactérias e células inflamatórias do tipo polimorfonucleares que se destacam no campo microscópico observado (SCOTT et al., 1996; GUEDES et al., 1997). Onde o agente bacteriano invade o estrato córneo e o folículo piloso, formando pápulas, que se rompem e formam crostas e colaretes epidérmicos, frequentemente associados ao prurido, devido às enzimas proteolíticas produzidas pelas bactérias (ROSSER, 2004). As lesões mais antigas costumam evoluir em áreas anulares de alopecia e hiperpigmentação (ETTINGER; FELDMAN, 2004).

Para o tratamento eficiente da piодermatite, é preciso identificar sua etiologia. O isolamento bacteriano pela cultura *in vitro* pode ser utilizado na identificação desses patógenos, se tornando uma ferramenta importante para a confirmação do diagnóstico de piодermite em animais de companhia. Os testes são mais precisos quando as amostras são obtidas a partir de pústulas intactas ou da ruptura induzida de lesões profundas (KAHN; LINE, 2010). A escolha do antimicrobiano a ser utilizado pode ser guiada pelo teste de sensibilidade aos antimicrobianos, o que auxilia o tratamento clínico, levando a uma melhora rápida do quadro infeccioso após o estabelecimento da terapêutica. Que pode ser realizada topicamente, por via sistêmica ou ainda em combinação (PATEL; FORSYTHE, 2010; SCOTT et al., 1996; GUEDES et al., 1997).

O antibiótico de escolha por via sistêmica para o tratamento de cães com piодermatite é a cefalexina (VITALE, 2009). Nos casos de piодermatite superficial, o tratamento com antibioticoterapia é indicado, por no mínimo 21 dias. E na piодermatite profunda é recomendado de 28 a 42 dias, com supervisão veterinária (HORVATH, 2007).

2.2. Otite

A otite é a inflamação dos condutos auditivos que pode ter o envolvimento de numerosos agentes etiológicos e fatores predisponentes que se relacionam com a infecção em cães e gatos, sendo classificada conforme sua localização (SCOTT et al., 2001; BIRCHARD; SHERDING, 2003; ETTINGER; FELDMAN, 2004). Entre as causas primárias estão a atopia, corpos estranhos, hipersensibilidade alimentar, neoplasias, distúrbios da queratinização, distúrbios glandulares, infecções e ectoparasitoses (ácaros), que são os exemplos mais comuns de otite em animais de companhia, onde os fatores perpetuantes (bactérias, leveduras) sustentam e agravam o processo inflamatório (SCOTT et al., 1996; YOSHIDA et al., 2002). Entre os mecanismos envolvidos nessa enfermidade estão incluídos também, a oclusão do canal auditivo; secreção de fatores irritantes; alterações do pH do canal e formação do foco da infecção (SCOTT et al., 2001; YOSHIDA et al., 2002; BIRCHARD; SHERDING, 2003; ETTINGER; FELDMAN, 2004).

A otite na forma crônica, onde há o envolvimento de ao menos uma causa primária e diversas causas perpetuantes e predisponentes, corresponde a até 76,7% dos casos de otopatias em cães. Nos gatos, a incidência é menor, por volta de quatro por cento, provavelmente devido à posição ereta da orelha e do conduto auditivo relativamente sem pelos (SCOTT et al., 2001; FARIAS, 2002). Estima-se que a otite externa afeta entre cinco e 20% da população canina (ETTINGER; FELDMANN, 2004) e, que representa de oito a 15% dos casos atendidos na prática clínica veterinária no Brasil (LEITE, 2000), sendo a otite externa crônica, responsável por até 76,7% dos casos (FARIAS, 2002). As bactérias que proliferam em associação com a otite externa são oportunistas e contribuem significativamente para as alterações patológicas, sendo muitas vezes estas a causa principal da resposta deficiente ao tratamento adotado para a causa primária (SCOTT et al., 2001; CARVALHO et al., 2010).

A microbiota normal do conduto auditivo externo canino é constituída por *Staphylococcus* spp., *Bacillus* spp. e *Malassezia pachydermatis* e altera-se em otopatas, onde *S. intermedius* é uma das principais bactérias isoladas (AUGUST, 1993; COLE et al., 1998; LILENBAUM et al., 2000). Podem ainda estar envolvidas nas otites bacterianas: *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa*, *Corynebacterium* spp., espécies beta hemolíticas de *Streptococcus* spp. e *Escherichia coli*. Na infecção

levedural pode-se encontrar: *M. pachydermotis* e *Candida* spp. (JUNGERMAN; SCHWARTZMAN, 1972; BIRCHARD; SHERDING, 2003; TILLEY; SMITH JR, 2003). O prurido auricular ou sacudidas de cabeça, exsudato e odor característico podem ser indicativos de otite externa em cães e gatos, e, pode ainda ser observado clinicamente: eritema, tumefação, formação de caspas, crostas, alopecia, pelos quebrados, otorrêia e dor a palpação da cartilagem auricular (SCOTT et al., 2001).

O tratamento bem sucedido da otite externa requer a identificação e cura da causa primária, e, eliminação ou controle de fatores perpetuadores e predisponentes (TILLEY; SMITH JR, 2003). Por isso, a importância do diagnóstico laboratorial, com o isolamento do patógeno envolvido (cultivo microbiológico) e a identificação de antimicrobianos eficazes (antibiograma), evitando reincidivas e a cronicidade da otite em animais de companhia.

2.3. *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus spp., é um coco Gram positivo com arranjos irregulares, anaeróbico facultativo (fermentativo), catalase positiva, oxidase negativa e imóvel, crescendo em ágar nutriente e ágar sangue. As espécies mais patogênicas são *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. hyicus*, todos coagulase positiva (QUINN et al., 2002), sendo que *S. aureus*, *S. intermedius* e *S. pseudintermedius* são patógenos oportunistas em cães (RUSCHER et al., 2009). O *S. intermedius* teve uma nova classificação como *S. pseudintermedius* (DEVRIESE et al., 2005). Através da identificação molecular demonstrou-se que isolados fenotipicamente identificados como *S. intemedius*, consistiam em três diferentes espécies: *S. intermedius*, *S. pseudintemedius* e *S. delphini*, que formam o grupo *S. intermedius* (GSI), onde foi descoberto que o *S. pseudintermedius* e não o *S. intermedius*, é o principal agente envolvido na piodermatite canina (BANNOEHR et al., 2007).

S. aureus produz grande variedade de fatores de patogenicidade e virulência, entre elas as estafiloquinases, hialuronidases, fosfatases, coagulases e hemolisinas (FORSYTHE, 2002). O MRSA (Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*) é um patógeno importante na medicina humana e está despertando interesse na medicina veterinária. A resistência a metilcilina também pode ser encontrada em *S. pseudintermedius* (WEESE; DUIJKEREN, 2010).

O teste de coagulase está correlacionado com a patogenicidade do agente (QUINN et al., 2002), uma vez que a produção de coagulase livre ou coagulase ligada (*fator clumping*) pode estar associada à capacidade de produção de toxinas por espécies de estafilococos e, desta forma, pode ser um indicador indireto do potencial patogênico (SANT'ANA; AZEREDO, 2005). *S. aureus* é naturalmente encontrado na microbiota da pele e nariz, e é uma das 32 espécies no gênero *Staphylococcus* spp., sendo o principal agente causador de infecções. Foi descoberto em 1884 por Anton Rosenbach (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

As várias espécies do gênero *Staphylococcus* spp., são comumente encontradas tanto em cães saudáveis como em doentes, podendo causar uma variedade de infecções, incluindo bacteremia, pneumonia, furúnculos, abscessos, piodermite, conjuntivite e otite externa. *S. intermedius* é a espécie mais frequentemente isolada em cães com otite (LILENBAUM et al., 1998), sendo também considerado patógeno primário 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 micro-organismo (SASAKI et al., 2005). As infecções estafilocócicas geralmente são tratadas com antibióticos, tendo como consequência uma considerável resistência aos mesmos, em longo prazo (HOEKSTRA; PAULTON, 2002).

Há um crescente interesse no estudo de *S. intermedius*, em especial, do *S. pseudintermedius*, pelo fato de ser o principal agente de piodermite e um dos principais micro-organismos relacionados à otite canina, sendo descrita primeiramente em 1976 na pele dos cães (VANDENESCH et al., 1995). Além disso, há o potencial zoonótico de cepas de *S. intermedius*, comumente relacionado a lesões invasivas, como mordidas por cães ou cateteres contaminados. Entretanto, é possível a infecção não invasiva de *S. intermedius* a partir de um cão contaminado para um ser humano, elevando ainda mais a importância de um tratamento eficaz dos cães com otite e/ou piodermatite, especialmente daqueles em contato próximo com pessoas imunodeprimidas, muito jovens ou idosos (TANNER et al., 2000). A transmissão zoonótica e antropozoonótica de *S. pseudintermedius* pode ocorrer, sendo uma preocupação no tratamento de doenças em animais, com enfoque importante para a saúde pública (STEGMANN et al., 2010).

2.4. Resistência microbiana

O uso indiscriminado de antimicrobianos ocasiona a seleção de micro-organismos resistentes entre as populações microbianas, impedindo a ação eficiente de diversos fármacos. A resistência aos antimicrobianos varia entre os diferentes micro-organismos nas diversas regiões do mundo, tendo como exemplo, *S. aureus* que apresenta cepas resistentes difundidas mundialmente (TAVARES, 2000). A crescente preocupação com a emergência de cepas resistentes, que possam infectar os seres humanos, está associada a diversos fatores, tais como: o uso de fármacos com ação antimicrobiana como promotores de crescimento; a exposição ambiental aos antimicrobianos; o contato com animais, em especial, os animais de companhia (cães e gatos), que são vistos como potenciais fontes de disseminação de cepas resistentes, entre outros (GUARDABASSI et al., 2004).

As bactérias no geral, incluindo as cepas resistentes, podem colonizar o ser humano e transferir seus genes de resistência a outras bactérias da microbiota normal desses indivíduos. Apesar de não se definir claramente em qual extensão o uso de antimicrobianos em animais contribui para a resistência bacteriana, na medicina humana, já existem evidências de que estas cepas possam circular do animal para o ser humano, e também para o meio ambiente (CIZMAN, 2003).

Um dos tipos de resistência desenvolvida pelas bactérias *Staphylococcus* spp., é a resistência ao grupo dos β -lactâmicos, que se iniciou antes da existência do primeiro antimicrobiano desta classe: a penicilina (ABRAHAM; CHAIN, 1940). Existem dois mecanismos conhecidos. Um deles é a produção de β -lactamases pelas bactérias, enzimas que catalizam a hidrólise dos β -lactâmicos (FUDA et al., 2005), destruindo o local onde os antimicrobianos β -lactâmicos se ligam às proteínas de ligação de penicilina bacteriana (*Penicilin Binding Protein* - PBPs), impedindo a atividade antimicrobiana (OLIVEIRA, 2011).

Estas enzimas são codificadas em cromossomos ou sítios extracromossômicos contidos em plasmídeos ou transposons, podendo ser produzidas de modo constitutivo ou serem induzidas. A resistência de *S. aureus* à penicilina é mediada por uma β -lactamase induzível, codificada por plasmídeo. Comercialmente, foram desenvolvidos β -lactâmicos capazes de se ligarem irreversivelmente às β -lactamases, inibindo o seu efeito. Estes compostos (ácido clavulânico, sulbactam, tazobactam) foram combinados com as penicilinas para

restaurar a atividade da β -lactamases em estafilococos e são utilizados usualmente tanto na clínica médica como veterinária (OLIVEIRA, 2011). A primeira β -lactamase foi identificada em *Escherichia coli* antes do lançamento da penicilina para uso na medicina humana (ABRAHAM; CHAIN, 1940).

O outro mecanismo de resistência dos *Staphylococcus* spp. ao grupo dos β -lactâmicos, é a resistência à meticilina, que acontece por meio da expressão de proteína de ligação de penicilina 2a (*Penicilin Biding Protein* – PBP2a), que não é susceptível à inibição por β -lactâmicos (FUDA et al., 2005), por possuir baixa afinidade à PBP2a. Esta proteína é altamente conservada entre os estafilococos, e é codificada pelo gene cromossômico *mecA* (NIEMEYER et al., 1996), localizado no interior da cassete móvel cromossômico SCC*mec* (DEURENBERG; STOBBERINGH, 2008).

A resistência dos micro-organismos ao grupo dos β -lactâmicos está ligada principalmente ao produto dos genes: *mecA* e *blaZ*. O gene *mecA* é responsável pela codificação da PBP alterada, denominada de PBP2a, que tem uma reduzida afinidade aos β -lactâmicos (BIGNARDI et al., 1996), e o gene *blaZ* tem como mecanismo de resistência a codificação da enzima β -lactamase ou penicilase, responsáveis pela hidrólise do anel β -lactâmico (LI et al., 2007).

A modificação das PBP's, sintetizadas pelo gene *mecA*, é um dos principais mecanismos de resistência descritos (AARESTRUP et al., 2001). O MRSA (*Staphylococcus aureus* resistente à *metilcilina*) contém a capacidade de resistência aos macrólidos, aminoglicosídeos, lincosamida, tetraciclina e outros antimicrobianos (SABET et al., 2006), e é resistente à meticilina devido à aquisição dos elementos SCC*mec* (HIRAMATSU, 1995), que transporta os genes *mecA* (KATAYAMA et al., 2000), sendo que existem vários tipos de elementos SCC*mec*, entre eles, os tipos I, II, e III (HIRAMATSU et al., 2001).

O principal determinante para o fenótipo de MRSA, é o gene *mecA*, cujo controle transcricional pode ser mediado por um repressor (*mecl*) e um sensor/indutor (*mecR1*). A indução de *mecl-mecR1*, mediada por *mecA* pode levar várias horas tornando as cepas sensíveis fenotipicamente, apesar da presença do gene de resistência. Por esta razão, tem sido proposto que a resistência total ao β -lactâmicos requer um sistema não funcional *mecl-mecR1* regulamentar. O gene *mecA* é incorporado em um cassete cromossômico (o elemento SCC*mec*) onde vários tipos estruturais têm sido descritos. Alguns clones de MRSA, tipicamente

expressando resistência aos β -lactâmico, transportam elementos SCC*mec* que contêm um locus intacto de *mecl-mecR1* (eg SCC*mec* tipos II e III) (OLIVEIRA, 2011).

Segundo Varaldo (1993), além desses mecanismos de resistência, deve-se levar em consideração o fenômeno conhecido como "Borderline oxacilin-resistant *Staphylococcus aureus*" (BORSA), que está associado a vários mecanismos de resistência na mesma bactéria, como a alteração do receptor PBPs, à hiperprodução de β -lactamases (penicilinases), e a produção de β -lactamases para além do clássico penicilinase (metecilinase). Perillo et al. (2012) destacaram, em seu trabalho, a importância das cepas BORSA no estudo da resistência bacteriana, com destaque para a saúde pública e medicina veterinária. Isto também requer um estudo aprofundado, a fim de aumentar a compreensão desse fenômeno e desenvolver respostas mais eficazes no controle bacteriano.

Na medicina veterinária, as causas mais comuns de tratamento com antimicrobianos em cães e gatos são: piodermites, infecções no trato respiratório, urinário, gastrointestinal e otite canina (GUARDABASSI et al., 2004), que são em sua maioria tratadas empiricamente, sem a confirmação do tipo de agente envolvido, resultando em uma má utilização dos antimicrobianos e ineficiência dos mesmos a longo prazo, tanto na medicina veterinária como na humana, já que ambas compartilham do uso de muitos princípios farmacológicos.

2.5. Formação de biofilme bacteriano

O biofilme é um agregado de micro-organismos envolvidos em uma matriz polimérica, com estrutura porosa e altamente hidratada, aderidos a uma superfície sólida (LAWEWNCE et al., 1991). A formação do biofilme proporciona às bactérias proteção contra a desidratação, colonização por bacteriófagos, fagocitose e também favorece a resistência aos antimicrobianos (GILBERT et al., 2003; ZHAO et al., 2008).

A produção de exotoxinas e proteínas de superfície, e a formação de complexos multicelulares altamente organizados (biofilme) são cada vez mais aceitos como um dos fatores de virulência importantes para *Staphylococcus* spp. (CUCARELLA et al., 2001, 2004; VASUDEVAN et al., 2003). Entre o gênero *Staphylococcus* spp., *S. aureus*, *S. epidermidis* e

S. saprophyticus, apresentam maior potencial patogênico e capacidade de produção e formação de biofilme (MCKENNY et al., 1998; MARTINEAU et al., 2001; JAGER et al., 2005).

Uma série de métodos fenotípicos foram desenvolvidos para o cultivo e quantificação de biofilme, mas o teste em microplaca de poliestireno com cristal de violeta, permanece sendo o mais utilizado (DEIGHTON et al. 2001, STEPANOVIC et al., 2007). Vários genes foram descritos como contribuintes para a produção de biofilme em várias espécies (VUONG et al., 2000; ARCIOLA et al., 2001; VASUDEVAN et al., 2003; KIMBERLY, 2004) e a detecção destes pode ser realizada pela técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR).

O conjunto de genes mais estudados e utilizados para identificação de *Staphylococcus* produtores de biofilme é o *locus ica* (*intercelular adhesion*) e, a co-expressão do gene *icaD*, que está inserido nesse *locus*, e é fundamental para a síntese completa do muco presente no biofilme. Este *locus* é um conjunto de quatro genes organizados em um operon (*icaADBC*) que é responsável pela expressão de uma adesina intercelular polissacarídica (*exopolysaccharide intercellular adhesin* - PIA), ou de N-acetilglicosamina polimérica (*poly-N-acetylglucosamine* - PNAG), onde a co-expressão dos genes *icaA* e *icaD* são fundamentais para a síntese completa da formação do biofilme (O'GARA, 2007).

A PIA tem sua localização na superfície celular, e é mediada por produtos dos genes cromossômicos *ica* que correspondem a quatro genes de adesão intercelular, *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, e um gene regulador *icaR* organizados em uma estrutura de operon, envolvidos na produção deste polissacarídeo. Esses genes codificam quatro proteínas necessárias para a síntese do PIA que são, *icaA*, *icaD*, *icaB* e *icaC*, respectivamente (ARCIOLA et al., 2001; CONLON et al., 2002; CAFISO et al., 2004; FITZGERALD et al., 2005). A expressão do gene *ica* está envolvida nas diversas etapas da formação do biofilme, e é um importante fator de virulência, sendo um dos mais estudados e utilizados para identificação de isolados de *Staphylococcus* spp. produtoras de biofilme (O'GARA, 2007).

2.6. Dermatofitose

A Dermatofitose é uma micose que acomete as camadas superficiais da pele sendo causada por fungos dermatófitos do gênero *Microsporum spp.*, *Trichophyton spp.* e *Epidermophyton spp.* (JUNIOR et al., 2000). E ocorre, via transmissão direta de esporos infecciosos de um hospedeiro suscetível, tendo como reservatório, pessoas, animais e ambientes contaminados (MORIELLO, 2004).

Esses fungos pertencem ao reino *Fungi*, filo *Mycota*. Quando na forma assexuada ou imperfeita são classificados na classe *Deuteromycota*, gênero *Epidermophyton spp.*, cuja diferenciação é realizada de acordo com a forma dos macroconídios. Os dermatófitos em estado sexuado ou perfeito, pertencentes à classe *Ascomycota*, estão reunidos nos gêneros *Nannizzia* e *Arthroderma*, que são formas perfeitas dos gêneros *Microsporum spp.* e *Trichophyton spp.* (MACIEL; VIANA, 2005). Os dermatófitos mais frequentes isolados de animais são *M. audouinii*, *M. canis*, *M. gypseum*, *T. tonsurans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum* e *T. schoenleinii* e são divididos em três grupos com base no habitat natural: geofílico, zoofílico e antropofílico (JUNIOR et al., 2000).

Alguns fungos presentes na pele de animais de companhia podem ser transmitidos ao homem e são responsáveis por micozoonoses superficiais. Os gatos, cães e alguns roedores estão comumente envolvidos. O *M. canis* e *T. mentagrophytes* são os dois fungos encontrados em maior frequência ocasionando estas enfermidades (NOËL et al., 2011). Outros grupos também implicados na etiologia das dermatofitoses são o *T. equinum* e *T. verrucosum*, e também a espécie geofílica de *M. gypseum* (CHERMETTE et al., 2008). Os dermatófitos zoofílicos frequentemente causam menor reação inflamatória nos animais do que os fungos geofílicos e antropofílicos (ARANTE et al., 2003). Pouco se sabe sobre a fisiopatologia da infecção (VERMOUT et al., 2008), mas acredita-se que enzimas proteolíticas são os principais fatores envolvidos na invasão do estrato córneo da pele (MONOD, 2008).

A infecção ocorre quando da exposição do animal a um dermatófito, seja pelo contato direto com outro animal ou pela contaminação ambiental. Ela vai ocorrer, pela ruptura mecânica do estrato córneo, facilitando a penetração e invasão dos folículos pilosos anagênicos. O pelo então é invadido tanto nas infecções ectotrix, como nas endotrix. A inflamação cutânea ocorre em virtude das toxinas

produzidas no estrato córneo da pele, que acabam provocando uma dermatite de contato. Os fatores do hospedeiro nas infecções pelos dermatófitos ainda não estão bem documentadas, entretanto, a capacidade destes fungos em montar uma resposta inflamatória desempenha um papel crítico na determinação do tipo de lesões clínicas produzidas e na resolução da infecção. Geralmente as infecções dermatofíticas em cães e gatos saudáveis são autolimitantes (SCOTT et al., 1996).

Há casos em que, a infecção por dermatófitos pode resultar em um quadro de hipersensibilidade, com o aparecimento de lesões vesiculares, onde as pústulas podem ser formadas nos folículos pilosos, aparecendo em várias partes do corpo, como parte da reação alérgica geral, resultando da propagação hematogênica dos fungos ou de seus produtos. Estas lesões não contêm o micro-organismo, sendo assim denominadas de dermatofítides. Invasores secundários bacterianos tais como *S. aureus* são comuns (CARTER, 1988). A ocorrência de dermatófitos em cães com dermatopatias diversas varia de 12,5% a 24,6% (AL-DOORY et al., 1968; BONE; JACKSON, 1971; PINARD et al., 1987). Sendo que a prevalência é maior em climas tropicais (MORIELLO et al., 1995).

Segundo Machado et al. (2004), a prevalência das dermatopatias, distribuídas por grupos de doenças foi de 7,6% como causa fúngica por dermatófitos na avaliação de 250 amostras de pele de cães, e destas, 73,7% tinham como agente etiológico *M. canis* e 26,3% *M. gypseum*. Os autores observaram pouca ou nenhuma inflamação ou prurido em infecções por *M. canis*, ao passo que *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* produziram prurido e inflamação moderada (FENNER, 2003).

Em cães, no exame clínico de enfermidades dermatológicas, é comum apresentar áreas anulares clássicas de alopecia, crosta, caspa, pápulas ou pústulas foliculares; já nos felinos ocorre com maior frequência áreas irregulares ou anulares de alopecia com ou sem caspa. Também os pelos aparecem quebrados e desgastados, a hiperqueratose folicular pode resultar em comedões, a alopecia pode ser grave e disseminada, acompanhada de pouca evidência de inflamação (SOUZA et al., 2002; CAVALCANTI et al., 2003; MENDOZA et al., 2009; BOND, 2010). A enfermidade varia desde infecções agudas autolimitantes, podendo haver cura espontânea, até quadros crônicos que persistem por meses ou anos (MACIEL; VIANA, 2005).

No tratamento de dermatofitose devem ser utilizados antifúngicos sistêmicos, pela alta densidade de pelos e pela possibilidade de inserção destes organismos nos folículos pilosos, associado a agentes tópicos, que se faz eficaz inclusive na redução de contágio direto entre animais e para o ser humano (MULLER et al., 1986). Segundo Moriello (2004), existem cerca de 17 estudos que informam sobre a eficácia da griseofulvina, itraconazol, terbinafina, ou lufenurão isoladamente ou em combinação com outras terapias no tratamento sistêmico de dermatofitose e três trabalhos que relatam a eficiência na utilização de vacinas na prevenção e tratamento de infecções fúngicas em animais de companhia.

O tratamento de todos os cães e gatos em contato com o animal infectado e o tratamento do ambiente é muito importante para a resolução da enfermidade (SCOTT et al., 1996). Os principais agentes antimicóticos utilizados em doenças fúngicas superficiais e sistêmicas são: os imidazóis (cetoconazol, miconazol, clotrimazol e enilconazol) e os triazóis (itraconazol e fluconazol); e entre os antifúngicos utilizados, está a griseofulvina, alilaminas (terbinafina) e benzoilfenilurea (lufenuron) (MACIEL; VIANA, 2005).

No tratamento tópico, os agentes antimicóticos mais comumente encontrados em cremes e pomadas incluem o clotrimazol (1%), econazol e miconazol (1-3%) (NOBRE et al, 2002) e em soluções de xampus, o cetoconazol 2%, miconazol 2%, enilconazol 0,2% e clorexidina 2-4% (LÓPEZ et al., 2002). Além de xampus com peróxido de benzoila (2,5 a 5%) e polivinilporrolidona-iodo (1%) (ANDRADE, 2002). O tratamento deve ocorrer por duas semanas após a remissão dos sinais clínicos ou até que duas ou três culturas fúngicas sejam negativas no intervalo de duas semanas, uma vez que a cura clínica sempre precede a cura micológica (MACIEL; VIANA, 2005).

Existem outros tratamentos, que utilizam a terbinafina (alilaminas), um fármaco altamente lipofílico de ação fungicida, por via oral, na dose 8,25mg/kg para cães e gatos, a cada 24 horas. O lufenuron, uma droga utilizada na prevenção e no controle de pulgas, mas que também possui atividade antifúngica, na dose de 80-100mg/kg a cada 24 horas em cães. Também preconizada no tratamento da dermatofitose em gatos sintomáticos e carreadores assintomáticos, onde a dose deve ser ajustada para 120mg/kg, com quatro repetições durante 21 dias (MACIEL; VIANA, 2005).

A vacina Biocan M[®], é composta por *M. canis* inativado e pode ser utilizada tanto na prevenção da dermatofitoses como no seu tratamento. A prevenção é feita com a aplicação da vacina em duas doses com intervalos de 14 a 21 dias a partir dos três meses de idade e reforço anual. No tratamento são feitas três doses, sendo a primeira no dia 0 (zero), a segunda aos 14 dias após a primeira aplicação e a terceira dose 24 dias após a segunda aplicação. A via de administração é injetável, a dosagem é de 1ml para cães e gatos, sendo a via subcutânea para gatos e intramuscular para os cães. A terceira dose fica a critério do médico veterinário, dependendo da evolução do quadro clínico do animal (LOPES, 2009).

Os testes fúngicos, como o cultivo fúngico, são muito importantes no diagnóstico das dermatofitoses, que podem sofrer regressão espontânea de meses a anos, necessitando de tratamento agressivo e longo nos casos crônicos (ARANTE et al., 2003; SCOTT et al., 2001). Na identificação macroscópica das colônias isoladas de *M. canis*, elas apresentam coloração branco castanho e verde amarelo na área periférica, com superfície da colônia frequentemente com aparência de lanugem irradiada e o lado inferior das colônias é frequentemente amarelo-ouro ou marrom (ASH; ORIHEL, 1990; DE LA MAZA et al., 1999). Na identificação microscópica, com a coloração com azul de lactofenol, os macroconídios de *M. canis* aparecem em forma de espiga ou fusiformes com a parede espessa, irregulares e rugosas, contendo de cinco a 15 células, medindo de 5µm a 20µm por 10µm a 100µm, com extremidades características em forma de maçaneta, e as hifas são septadas (RIDDELL, 1950; DE LA MAZA et al., 1999).

Já *M. gypseum*, apresenta uma superfície branco-castanho, bordas brancas tipo estrela rompida e uma aparência acamurçada, com áreas de coloração vermelho-marrom, comuns no lado inferior, sendo que as colônias crescem rapidamente (ASH; ORIHEL, 1990; DE LA MAZA et al., 1999). Na coloração com azul de lactofenol, os macroconídios de *M. gypseum* apresentam forma elipsoide ou fusiforme com uma parede irregular e delgada, contendo quatro a seis células, medindo de 7µm a 15µm por 30µm a 60µm. O sítio de ligação das hifas é usualmente plano, enquanto que a extremidade distal é mais arredondada. As hifas são septadas e o microconídio tem uma forma de clava ou bastão, mas esta característica não é útil para a diferenciação de outros fungos que produzem estruturas similares (RIDDELL, 1950; DE LA MAZA et al., 1999).

A eficácia do tratamento da dermatofitose dependerá de diagnóstico prévio, com identificação do gênero e espécie determinante da doença, e da indicação correta de um fármaco eficiente (SILVA et al., 1998). Como as dermatofitoses são infecções contagiosas com elevada prevalência na América Latina (BETANCOURT et al., 2009) e caracterizadas como zoonoses, não é raro observar animais, mas também o homem atingido por estas enfermidades (PINHEIRO et al., 1997), enfatizando, assim, a importância do diagnóstico preciso, de medidas profiláticas e do tratamento correto a fim de se evitar tais infecções.

2.7. Alternativas antimicrobianas

Uma das principais preocupações mundiais é o uso indiscriminado de antimicrobianos e, conseqüentemente, o aumento da resistência bacteriana (CASTRO et al., 2002), que tem sido atribuída a uma combinação de características microbiológicas. Esse fato torna necessário o emprego prudente dos fármacos antimicrobianos existentes, e o desenvolvimento da pesquisa, incluindo novos princípios ativos, vacinas e alternativas de tratamento (COHEN, 1992).

A Caatinga é um bioma semiárido do nordeste do Brasil, com uma rica biodiversidade, embora ocorra uma má conservação ambiental, com menos de 1% do território em conservação. Além de previsões climáticas que preveem aumentos de aridez, que podem representar ameaças adicionais à biodiversidade do bioma Caatinga (OLIVEIRA et al., 2012). As plantas medicinais encontradas na vegetação da caatinga possibilitam a descoberta de novos fármacos e isto tem estimulado o estudo do conhecimento local desses recursos naturais (ALMEIDA et al., 2012).

A fitoterapia é uma terapia medicinal que vem crescendo notadamente nos últimos anos, e também tem sido considerada uma terapia alternativa (YUNES et al., 2001; CANTER; ERNST, 2004; TINDLE et al., 2005; SILVA et al., 2006; BROWNIE, 2006; CARVALHO et al., 2008; VEIGA-JUNIOR, 2008). O uso dos fitoterápicos no Brasil está em expansão, fazendo do mesmo um mercado promissor (CARVALHO et al., 2008). No entanto, o Brasil não tem uma atuação destacada no mercado mundial de fitoterápicos, ficando inclusive atrás de países menos desenvolvidos tecnologicamente. Esperar-se-ia que ele fosse um país privilegiado, por sua extensa e diversificada flora e um grande número de grupos de pesquisas (YUNES et al., 2001). Entre eles: Canter e Ernst (2004), Ribeiro et al. (2005), Tindle et al. (2005),

Turolla e Nascimento (2006), Silva et al. (2006), Brownie (2006), Carvalho et al. (2008), Veiga-Junior (2008), entre outros, que têm contribuído significativamente para o desenvolvimento da química de produtos naturais de plantas, da quimiotaxonomia, da farmacologia de produtos naturais e outras áreas relacionadas tecnologicamente.

Estes produtos naturais podem ser tão eficientes quanto aos produzidos pela síntese química. Contudo, a transformação de uma planta em um medicamento deve visar à preservação da integridade química e farmacológica do vegetal, garantindo a conservação de sua ação biológica e a sua segurança de utilização, além de valorizar seu potencial terapêutico. Para atingir esses objetivos, a produção de fitoterápicos requer, necessariamente, estudos prévios relativos aos aspectos botânicos, agrônômicos, fitoquímicos, farmacológicos, toxicológicos, de desenvolvimento de metodologias analíticas e tecnológicas (MIGUEL; MIGUEL, 1999; YUNES et al., 2001). O desenvolvimento da indústria de fitoterápicos no Brasil é de fundamental importância, devido aos recursos humanos e tecnológicos envolvidos e disponíveis no País (YUNES et al., 2001).

A atividade antimicrobiana de líquens, ou de seus compostos isolados, tem sido estudada há muitos anos. Os primeiros estudos foram iniciados por Burkholder et al. (1944), e foi seguido por vários pesquisadores, principalmente com o isolamento do ácido úsnico e caracterização de sua atividade antimicrobiana (CARRAZZONI, 1975; HUOVINEN; AHTI, 1986; AHTI et al., 1993; LAUTERWEIN et al., 1995; HONDA; VILEGAS, 1998; YANO-MELO et al., 1999; DONLAN, 2001; FALCÃO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2006; MOURA et al., 2008), utilizando espécies de líquens presentes no bioma da Caatinga brasileira e de áreas de transição.

2.8. *Cladonia substellata* Vainio

A *C. substellata* (Figura 1 e 2) é um líquen encontrado em diversos continentes do mundo, inclusive no nordeste do Brasil. É um organismo simbiótico, composto por um fungo (micobionte) e uma ou mais algas (fotobionte) (NASH, 1996), produtores de metabólitos secundários, denominados substâncias liquênicas, também conhecidas como ácidos liquênicos. Atualmente, sabe-se que se trata de derivados fenólicos e carboidratos exclusivos, sendo que estes metabólitos são os

principais responsáveis por grande parte de sua bioatividade (FALCÃO et al., 2004). As substâncias ativas são em geral depsídeos, depsídonas e ácidos úsnicos, dentre outras classes de compostos, alguns, ainda, não identificados (RIBEIRO, 2006).

As substâncias líquênicas são pouco eficientes contra bactérias Gram-negativas e eficientes contra as Gram-positivas, inibindo seu crescimento por produzir substâncias com propriedades antimicrobianas, que podem variar qualitativa e quantitativamente em uma mesma espécie, dependendo das condições ambientais (FALCÃO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2006). *C. substellata*, encontrada no nordeste do Brasil, em áreas de transição da Caatinga com o cerrado brasileiro, é conhecida por ter a maior concentração de ácido úsnico entre os líquens, com 98% da sua constituição química, representando 7,3% do peso seco do talo (HUOVINEN; AHTI, 1986; AHTI et al., 1993; YANO-MELO et al., 1999).

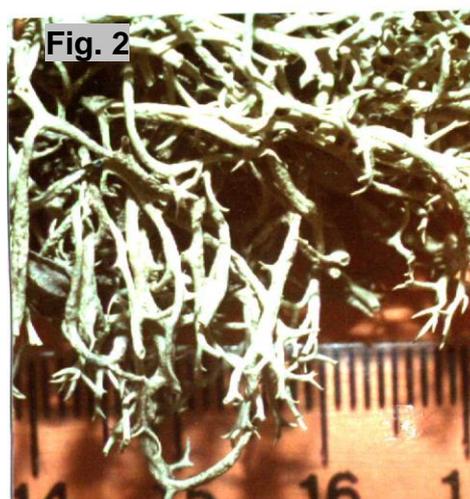


Fig. 1 e 2- *Cladonia substellata* Vainio (Fotos cedidas pela Prof^a. Dr.^a Eugênia Cristina Gonçalves Pereira – UFPE/2013).

2.9. Ácido úsnico

O ácido úsnico, o [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil- 1,3-(2h,9bH)-dibenzofurano] (C₁₈H₁₆O₇) com peso molecular de 344,4 g/mol, ocorre na natureza em duas formas enantioméricas (+) e (-), as quais dependem da projeção do grupo metila angular localizado na posição do carbono quiral 9b (Figura 3). É um constituinte abundante em diversos gêneros de líquens filogeneticamente distintos, tais como *Usnea*, *Cladonia*, *Cetraria*, *Ramalina* e *Parmelia* (VENKATARAMANA; KRISHNA, 1992; MÜLLER, 2001; COCHIETTO et al., 2002; INGÓLFSDÓTTIR, 2002; CARVALHO et al., 2005). Foi isolado pela primeira vez de *Ramalina calicaris*,

de *Usnea barbata* e de outras espécies de líquens em 1834 (ROCHLEDER et al., 1996).

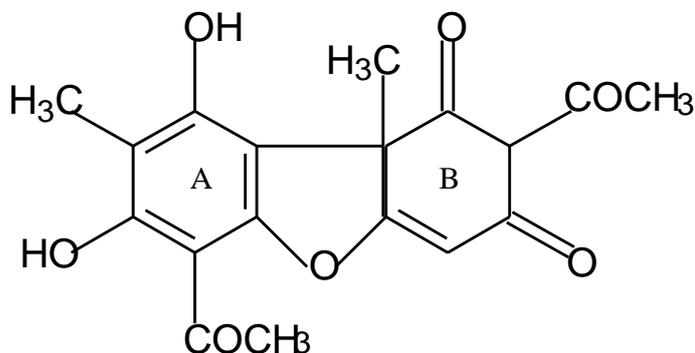


Fig. 3- Modelo estrutura do ácido úsnico (PEREIRA, 1998).

É um pigmento amarelo cortical encontrado somente em líquens (CARVALHO et al., 2005), com ponto de fusão em torno de 203°C, de forte caráter hidrofóbico, insolúvel em água e glicerol, parcialmente solúvel em etanol e facilmente solúvel em éter quente, acetona, benzeno e clorofórmio, um composto derivado do metabolismo secundário liquênico que desempenha importante papel biológico, conferindo aos líquens proteção contra micro-organismos invasores, raios UV e ressecamento (COCHIETTO et al., 2002).

Das classes de compostos de baixo peso molecular, derivados de líquens, o ácido úsnico tem sido mais extensivamente estudado (MÜLLER, 2001). Sua utilização atualmente ocorre para fins medicinais, produtos de perfumaria e aplicações ecológicas, com formulações em creme, pasta de dente, antisséptico bucal, desodorantes e produtos de proteção solar, seja como princípio ativo ou conservante (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Do ponto de vista econômico, deve ser destacado o papel dos líquens como alimento de animais, na fabricação de bebidas fermentadas (costume praticado até o século XIX, principalmente na Suécia e na Rússia, na fabricação de aguardente). Também como veneno (ácido vulpínico e ácido pinástrico) e pela sua ação farmacológica, com destaque para a propriedade antimicrobiana. E pode, ainda, ser destacado por sua utilização em perfumarias (largamente utilizado na formulação de *Chipes* e dos chamados perfumes orientais), sendo a França o principal produtor, como tanantes (no curtimento de peles) e pelas propriedades tintoriais (CARRAZZONI, 1975).

Por ser considerado um agente antimicrobiano, é constituinte de diversas preparações farmacêuticas, tais como: dentífrico, colutório, óvulos vaginais,

antitranspirante e desodorante; em cápsulas como suplemento dietético - LipoKinetix®, atualmente fora do mercado devido à hepatotoxicidade (MOURA et al., 2008).

O ácido úsnico que está presente no líquen *C. substellata*, é um derivado do dibenzofurano, e tem apresentado uma vasta gama de atividades biológicas, entre elas: atividade antimicrobiana; antifúngica; antineoplásica; antiviral; antipirética; anti-inflamatória; analgésica; antiprotozoários; inseticida; hidratante; anti-histamínica, e, atua também na proteção contra raios UV (FOURNET et al., 1997; COCHIETTO et al., 2002; INGÓLFSDÓTTIR, 2002; FALCÃO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2006). Ele apresenta atividade antimicrobiana, em particular contra *Streptococcus mutans*, agente etiológico de cáries e periodontites (MOURA et al., 2008).

Lauterwein et al. (1995) demonstraram que metabólitos secundários de diferentes espécies de líquens foram inativos contra bactérias Gram-negativas e fungos; entretanto, possuíam atividade inibitória contra *S. aureus*, *Enterococcus faecalis*, *E. faecium* e algumas bactérias anaeróbicas como *Bacteroides spp.* e *Clostridium spp.* Segundo Gupta et al. (2012), o L(-)ácido úsnico exerce atividade antibacteriana contra MRSA, pela ruptura da membrana celular (CARDARELLI et al., 1997; HONDA; VILEGAS, 1998).

Dentre os efeitos tóxicos descritos para o ácido úsnico, está a interferência nos processos de fosforilação oxidativa (HONDA; VILEGAS, 1998). Estudos demonstraram que o ácido úsnico pode fazer com que ocorra o desacoplamento da fosforilação oxidativa mitocondrial por meio de suas propriedades lipofílicas (ABO-KHATWA et al., 1996). Sabe-se, também que esse ácido atua sobre o metabolismo do DNA (ácido dextrorribonucleico) em células animais inibindo a fusão nuclear, apresentando também atividade anti-histamínica, espasmolítica e antiviral (HONDA; VILEGAS, 1998). Além disso, em baixas concentrações exibe a capacidade de estimular o metabolismo celular (CARDARELLI et al., 1997). Vicente (1975) associou a atividade antimicrobiana das substâncias líquênicas pela alteração da permeabilidade das paredes celulares bacterianas, e segundo Vicente e Cifuentes (1981), o ácido úsnico pode reagir de maneira preferencial com compostos químicos das paredes celulares de bactérias Gram-positivas, justificando um dos mecanismos antimicrobianos que podem estar correlacionado a esse grupo bacteriano.

Os efeitos deletérios do ácido úsnico em células de mamíferos têm sido relatados, por inibição da proliferação celular e citotoxicidade causado em cultura de

queratinócitos (KUMAR; MULLER, 1999). O tratamento de ratos com ácido úsnico inibiu a proliferação de eritrócitos policromáticos, possivelmente por interferir na biossíntese de RNA (ácido ribonucleico) (AL-BEKAIRI et al., 1991). Mesmo apresentando diversas atividades biológicas, a utilização do ácido úsnico na terapêutica é limitada devido a propriedades físico-químicas desfavoráveis, como a sua baixa solubilidade e, especialmente, a sua hepatotoxicidade quando ingerido por via oral em mamíferos (ANDRADE et al., 2006; ROACH et al., 2006).

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Isolados bacterianos

O estudo foi realizado com 136 isolados de *Staphylococcus* spp. (Tabela 1) oriundos de amostras de piodermite e otite de cães e gatos provenientes das cidades de Petrolina (Pernambuco), Erechim (Rio Grande do Sul), Santa Maria (RS), Santa Cruz do Sul (RS) e Caçapava do Sul (RS), obtidos entre 1990 e 2012.

Tabela 1 – Resenha dos isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de piodermatite e otite em cães e gatos nos estados de Pernambuco (PE) e Rio Grande do Sul (RS).

| Origem clínica das amostras (n ¹) | Espécie Animal (n) | Amostra (n) | Cidade/ Estado de coleta | Período de coleta |
|-----------------------------------------------|------------------------------------------|-------------|--------------------------|-------------------|
| Pele/ Piodermatite (86) | Cães ² (76 amostras) | 75 | Petrolina (PE) | 2011 a 2012 |
| | | 01 | Santa Maria (RS) | |
| | Gatos ³ (10 amostras) | 10 | Petrolina (PE) | 2012 |
| Orelha externa/otite (50) | Cães (49 amostras) | 24 | Petrolina (PE) | 2012 |
| | | 23 | Santa Maria (RS) | 1990 a 1995 |
| | | 01 | Santa Cruz do Sul (RS) | 1990 |
| | | 01 | Caçapava do Sul (RS) | 1990 |
| | Gatos (01 amostra) | 01 | Petrolina (PE) | 2012 |

Total: 136 *Staphylococcus* spp.

1. número total de amostras obtidas, de acordo com a origem clínica, 2. espécie *Canis familiaris*, 3. espécie *Felis domesticus*.

Dos 136 isolados de *Staphylococcus* spp., 110 foram coletadas em Petrolina (PE) e obtidas junto à clínicas particulares e ao Hospital Veterinário da UNIVASF, por meio de *swabs* estéreis em meio *Stuart* modificado sob refrigeração, e foram encaminhadas no prazo de 24 horas, ao laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal, do Campus de Ciências Agrárias da UNIVASF (Petrolina/PE), no período de 2011 a 2012.

Os outros 26 isolados foram cedidos pelo Laboratório de Bacteriologia (LABAC) do Departamento de Medicina Veterinária Preventiva da Universidade Federal de Santa Maria, sendo que as amostras foram provenientes das cidades de

Santa Maria (RS), Santa Cruz do Sul (RS) e Caçapava do Sul (RS), obtidas entre os anos de 1990 e 1995. No LABAC as amostras foram identificadas, liofilizadas, refrigeradas e encaminhadas para Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do Campus de Ciências Agrárias da UNIVASF no ano de 2011.

3.2. Material liquênico

O extrato orgânico do líquen *C. subtellata* e o ácido úsnico purificado, foram cedidos pela Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). *C. substellata* foi coletada sobre solos arenosos de tabuleiros costeiros do município de Mamanguape da Paraíba, área de tabuleiro costeiro nordestino, e identificada através das características morfológicas e químicas de seu talo. Em seguida, foram obtidos extratos orgânicos, bem como foi isolado e purificado o ácido úsnico no laboratório de Produtos Naturais da UFPE.

3.3. Preparação do extrato orgânico de *C. substellata* e isolamento do ácido úsnico

A partir de 20g do talo liquênico seco foram obtidos extratos orgânicos por sistema de esgotamento à temperatura ambiente (28 ± 3 °C), seguindo a série eluotrópica éter, clorofórmio e acetona. O material foi triturado em almofariz e extraído com 100ml de éter etílico em agitação por 1h, sendo em seguida mantido em repouso por 24h a 6°C. Após esse período, o material foi filtrado e o resíduo extraído com o mesmo volume de clorofórmio. Em seguida, após filtração, o resíduo foi novamente extraído com acetona, sob as mesmas condições. Os extratos foram, então, evaporados à temperatura ambiente e mantidos em dessecador até peso constante (NÓBREGA et al., 2012). O ácido úsnico foi isolado e purificado pelo método de re-cristalização a partir do extrato seco de éter etílico (PEREIRA, 1998), no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Pernambuco – UFPE.

3.4. Cromatografia em Camada Delgada (CCD)

O extrato etéreo, clorofórmico e acetônico foram submetidos à cromatografia ascendente em placas de sílica gel 60 F254+366 (Merck) com 20×20cm, sendo desenvolvidas nos sistemas de solventes A (tolueno/dioxano/ácido acético, 180:45:5 v/v) e B (hexano/éter etílico/ácido fórmico, 130:80:20 v/v), segundo Culberson (1972). As bandas obtidas foram visualizadas sob luz UV a 254nm e 366nm. As cromatoplasas foram então reveladas com H₂SO₄ a 10% e aquecidas a 100 °C por 10 min. As bandas evidenciadas foram comparadas por meio de reação de coloração e valores de R_f (Fator de Retenção), com os padrões de ácidos úsnico, estíctico e nortístico aplicados como referência.

3.5. Identificação bacteriana

3.5.1. Identificação morfológica e bioquímica

Os isolados bacterianos, obtidos de amostras de piodermatite e otite de cães e gatos pertenciam a bacterioteca do Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal da UNIVASF, no campus da fazenda experimental, Petrolina (PE). As amostras foram semeadas em ágar sangue a 5%, com o auxílio de uma alça de platina e depois levadas para a estufa a 37°C. A leitura das placas foi realizada em 24h e 48h, e os agentes bacterianos identificados por meio de características morfológicas coloniais, bioquímicas (Manitol Semi Sólido, Glicose Semi Sólida, Purple Ágar Base Maltose, urease, catalase, oxidase, Dnase e coagulase com plasma de coelho em tubo) e tintoriais (coloração de Gram) (QUINN et al., 2005), onde a habilidade na produção da enzima coagulase dividiu os estafilococos em dois grupos, os coagulase positivos e coagulase negativos (ZIEBUHR et al., 2006).

3.5.2. Identificação molecular

Para a identificação molecular primeiramente o DNA bacteriano foi extraído e purificado seguindo adaptações dos protocolos descritos por Wade et al. (2005) e Ausubel et al. (1989). Uma alçada de cultivo de cada isolado foi colocada em 300µl de TE (Tris-EDTA), e inativadas por calor (10min- 80°C) em banho seco. Em

seguida, acrescentou-se 70µl de SDS 10%, com posterior adição de 100µl de NaCl₂ 5M e 80µl CTAB/NaCl. Essa solução foi incubada a 65°C por 10min. Depois foram adicionados 700µl de clorofórmio/álcool isoamílico (24:1), com homogeneização por inversão e centrifugação a 11.750g por 5min. Após, foi feita a transferência da 1ª fase para outro tubo e foram acrescentados 450µl de isopropanol, deixando em gelo por 20 minutos, com centrifugação a 11.750g por 15min, desprezando o sobrenadante e acrescentando 500µl de etanol 70%, com centrifugação a 11.750g por 10min. Desprezou-se o sobrenadante, secou-se o *pellet* em temperatura ambiente que em seguida foi ressuscitado em 80µl de TE (pH 8,0), deixando-o a 65°C por 1 minuto. O armazenamento foi realizado a -20°C.

Na caracterização molecular de *S. aureus* foi identificado pela presença do gene *nuc* (279pb) com os iniciadores: F - 5'-GCGATTGATGGTGATACGGTT-3' e R- 5'-AGCCAAGCCTTGACGAACTAAAGC-3' (KATEETE et al., 2010). Quatro microlitros do DNA molde não quantificado, extraído dos isolados bacterianos, foi adicionado em 11µl de mix contendo, 0,66µM de cada um dos iniciadores, 0,4mM de dNTPs, tampão de enzima 1X diluído, 2mM de MgCl₂ e 1,5U de Taq DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador (AMPLITHERM Plus-TX96+G), com desnaturação inicial a 94°C por 5min, seguida por 37 ciclos, consistindo, cada uma de 94°C por 1 min; hibridação do iniciador a 55°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 1 min, seguidos por uma extensão final a 72°C por sete minutos (adaptado de KATEETE et al., 2010).

S. epidermidis foi identificado pelo fragmento de 130pb do gene *rdr*, com os iniciadores: SERF 5'-AAGAGCGTGGAGAAAAGTATCAAG-3' e SERR 5'TCGATACCATCAAAAAGTTGG3' (SHOME et al., 2011). Cinco microlitros do DNA molde não quantificado, extraído dos isolados bacterianos, foram acrescentados em 20µl de mix contendo, 0,5µM dos iniciadores, 0,4mM de dNTPs, tampão de enzima 1X diluído, 1,5mM de MgCl₂ e 2,5U de Taq DNA polimerase. As amplificações foram realizadas em termociclador (AMPLITHERM Plus-TX96+G), com desnaturação inicial a 94°C por 5 min, seguida por 30 ciclos, consistindo cada um de uma desnaturação a 94°C por 30 segundos; hibridação do iniciador a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 45 segundos, seguidos por uma extensão final a 72°C por 10 minutos (adaptado de SHOME et al., 2011).

Os produtos foram acrescentados de 5µl de tampão de carregamento de DNA e o resultado da PCR foi verificado em gel de agarose a 1,5%, corado com brometo de

etídio e documentado por meio do sistema de captura de imagem Kodak Digitalscience 1D. Como controle positivo das reações, foram incluídos *S. aureus* ATCC 25923 (*nuc*) e *S. epidermidis* ATCC 12228 (*rdr*) e água livre de nucleases (controle negativo).

3.6. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

3.6.1. Teste fenotípico

O perfil de sensibilidade dos micro-organismos foi determinado por meio do método de difusão em disco Kirby-Bauer modificado (BAUER et al., 1966). Os isolados foram semeados em caldo Müller-Hinton e incubados a 37°C até obtenção de turbidez de 0,5 da escala Mac Farland. Com auxílio de um *swab*, os isolados foram semeados em placas de Petri contendo ágar Müller-Hinton. Logo após, foram aplicados os discos impregnados com as seguintes grupos/drogas antimicrobianas: i) beta lactâmicos: ampicilina (AMP 10µg), penicilina (PEN 0µg), amoxicilina com ácido clavulânico (AMC 30µg) e oxacilina (OXA 1µg); ii) aminoglicosídeos: estreptomicina (EST 10µg) e gentamicina (GEN 10µg); iii) quinolonas: enrofloxacina (ENO 5µg); iv) macrolídeos: eritromicina (ERI 15µg); v) sulfonamidas: sulfametaxona (SUT 25µg); vi) tetraciclina: tetraciclina (TET 30µg); vii) cefalexinas: cefalexina (CFE 30µg), cefalotina (CFL 30µg), ceftriaxona (CRO 30µg); viii) lincosamidas: clindamicina (CLIND 2µg); ix) alfenicóis: cloranfenicol (CLO 30µg) (OLIVEIRA et al., 2004). As placas foram incubadas em estufa durante 24h a 37°C. Após a leitura dos halos, foi determinado o perfil de sensibilidade dos isolados, obedecendo à classificação: Sensível, Intermediário e Resistente de acordo com o documento M31-A3 (CLSI, 2008). O Índice de Resistência Múltipla aos Antimicrobianos (IRMA) foi calculado conforme metodologia descrita por Krumperman (1983), sendo este índice determinado pela relação entre o número de antimicrobianos que a amostra foi resistente e o número total de antimicrobianos do grupo dos β-lactâmicos testados.

3.6.2. Teste genotípico

A confirmação molecular da presença de genes ligados a fatores de resistência ao grupo dos antimicrobianos β -lactâmico ocorreu pela amplificação de parte dos genes *mecA* e *blaZ*. Na amplificação do gene *mecA* foram utilizados os iniciadores F-5'-AAAATCGATGGTAAAGGTTGGC-3' e R-5'-AGTTCTGCAGTACCGGATTTGC-3' (COELHO et al., 2007), que amplificaram uma região de 217pb. Na amplificação do gene *blaZ* foram utilizados os iniciadores F-5'-AAGAGATTTGCCTATGCTTC-3' e R-5'-GCTTGACCACTTTTATCAGC-3' (SAWANT et al., 2009) que amplificaram um fragmento de 517pb.

Como DNA molde foram utilizados 4 μ l do DNA não quantificado, extraído dos isolados bacterianos como descrito no item “identificação bacteriana/identificação molecular”. Para a amplificação do gene *mecA*, ao DNA foram acrescentados 0,4 μ M de cada iniciador, 0,4mM dos desoxirribonucleotídeos, tampão de enzima 1X diluído, 2 mM MgCl₂ e 1,5U de *Taq*, em um volume final de 15 μ l. Esta reação foi levada ao termociclador (AMPLITHERM Plus-TX96+G) e submetida a desnaturação inicial a 94°C por 1 min, seguida por 15 ciclos, que consistiram de uma desnaturação inicial à 94°C por 30 segundos, 68°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, seguidos por mais 20 ciclos, constituídos de 30 segundos a 94°C, 30 segundos a 60°C, 30 segundos a 72°C e uma extensão final a 72°C por 2 minutos (adaptado de COELHO et al., 2007). Para amplificação do gene *blaZ*, ao DNA foram acrescentados 0,4 μ M de cada iniciador, 0,4mM dos desoxirribonucleotídeos, Tampão 1X diluído, 2mM de MgCl₂ e 1,5U de *Taq*, em um volume final de 15 μ l. A reação foi conduzida ao termociclador (AMPLITHERM Plus-TX96+G) e submetida a desnaturação inicial à 94°C por 4min, seguida por 30 ciclos, consistindo de 94°C por 1 minuto, 50,5°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos, uma extensão final a 72°C por 5 minutos (SAWANT et al., 2009).

Os produtos foram analisados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e documentado por meio do sistema de captura de imagem (Kodak Digitalscience 1D) (adaptado de COELHO et al., 2007 e SAWANT et al., 2009).

3.7. Caracterização da produção de biofilme em isolados de *Staphylococcus* spp.

3.7.1. Caracterização fenotípica da produção de biofilme bacteriano

A análise quantitativa da formação de biofilme em microplacas de poliestireno de 96 poços dos 136 isolados de *Staphylococcus* spp., foi realizada pelo método proposto por Merino et al. (2009) com algumas modificações. Na caracterização fenotípica para formação de biofilme, os isolados de *Staphylococcus* spp., previamente identificados e refrigerados, foram semeados em soja ágar trípticos (TSA) e incubados a 37°C por 24 horas. As colônias isoladas foram inoculadas em 3ml de caldo de tripticase de soja (TSB) até turvação de 0.5 MacFarland e incubadas a 37°C por 24 horas.

Após esta etapa, 5µl foram repassados para placas de microdiluição contendo 195µl de TSB e novamente incubados a 37°C por 24 horas. Posteriormente, foram lavadas três vezes com 200µl de água destilada e deixadas secar em temperatura ambiente (TA). As placas foram então, coradas com 100µl de cristal violeta 0,25% por 2min a 3min em TA e em seguida ocorreram três novas lavagens com água destilada. Para dissolver o corante, utilizando-se 200µl de álcool-acetona (80:20). A absorbância foi medida em leitora de placa de ELISA e mensurada com filtro de 620nm.

Todas as análises foram realizadas em triplicata, bem como os controles positivo e negativo. Como controle positivo foi utilizado uma cepa padrão de *S. aureus* (ATCC 25923) anteriormente caracterizadas genotipicamente para produção de biofilme. Após a leitura, as amostras foram classificadas em quatro categorias: não aderente (0): quando a DO (densidade óptica) obtida for menor que a DO do controle negativo (DOc); fracamente aderente (+): $DOc < DO \leq 2x DOc$; moderadamente aderente (+ +): $2x DOc < DO \leq 4x DOc$ e fortemente aderente (+ + +): $4xDOc \leq DO$. Todos os ensaios foram repetidos três vezes (adaptado de MERINO et al., 2003).

3.7.2. Caracterização genotípica da produção de biofilme bacteriano

Para a amplificação do gene *icaD*, utilizou-se os iniciadores: ICADF (5'AAA CGT AAG AGA GGT GG3') e ICADR (5'GGC AAT ATG ATC AAG ATA C3') e que amplificaram um fragmento de 381pb (VASUDEVAN et al., 2003). A reação constou de 1,33mM de MgCl₂, 0,2mM de dNTPs, 1μM de de cada iniciador, 1,5U de Taq polimerase e 2μl de DNA extraído conforme descrito no item "identificação bacteriana/identificação molecular", em um volume final de 15μl. Esta reação foi levada ao termociclador (AMPLITHERM Plus-TX96+G) e submetida à desnaturação inicial a 94°C por 2min, seguida por 30 ciclos constituídos de 2min a 94°C, 45 segundos a 92°C e 1 min a 72°C e uma extensão final a 72°C por 7min. Os produtos foram analisados em gel de agarose 1,5%, corado com brometo de etídio e documentado por meio do sistema de captura de imagem (Kodak Digitalscience 1D) (adaptado de VASUDEVAN et al., 2003). Como controle das reações, foram incluídos *S. aureus* ATCC 25923 (controle positivo) e água livre de nucleases (controle negativo).

3.8. Determinação da atividade antibacteriana do extrato orgânico de *C. subtellata* e do ácido úsnico frente *Staphylococcus* spp.

Foi realizada a determinação da atividade antibacteriana *in vitro* do extrato orgânico de *C. subtellata* e do ácido úsnico purificado, frente aos 136 *Staphylococcus* spp. isolados neste trabalho, com a determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), baseadas no documento CLSI, (2010), utilizando-se as seguintes concentrações: 0,25mg/ml; 0,125mg/ml; 0,0625mg/ml; 0,0312mg/ml; 0,0156mg/ml; 0,0078mg/ml; 0,0039mg/ml e 0,0019mg/ml, em triplicata, seguindo o documento M100-S20 (CLSI, 2010).

Obteve-se uma suspensão bacteriana com turvação equivalente a turbidez de 0,5 da escala de Mc Farland, a partir do inóculo cultivado em ágar Muller-Hinton. Após diluição dos extratos à concentração de 0,50mg/ml estes foram diluídos em 200μL (1:2) de caldo Muller-Hinton (MH). Desta suspensão, foi inoculado 10μL (1x10⁴UFC/ml) em cada microtubo contendo a diluição do extrato. O material foi incubado a 37°C/24h, em condições de aerobiose e na sequência foi determinada a CIM₅₀ e CIM₁₀₀, considerando a inibição visual parcial e total do crescimento

bacteriano. A partir das diluições onde não foi verificado crescimento bacteriano visível foi retirada uma alíquota de 10µl, e semeada na superfície de ágar MH sendo incubada por 24h a 37°C. Na sequência, foi determinada a CBM como a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do micro-organismo testado. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos três vezes.

3.9. Interação do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado com o biofilme bacteriano consolidado

Foram avaliados 19 isolados de *Staphylococcus* spp. previamente identificados como produtores de biofilme. A formação de biofilme em microplacas foi obtida a partir da incubação de 100µl da suspensão bacteriana (inóculo) em cada poço da placa contendo 96 poços, por 24 h a 37°C. Em seguida, os poços foram lavados três vezes com água destilada, e então acrescidos de 100µl do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado na concentração de 0,25mg/ml, concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano de todas as 136 *Staphylococcus* spp. testadas (CIM₁₀₀ e CBM₁₀₀). A densidade ótica (DO) foi determinada imediatamente após a adição do extrato (0h) e 24h depois. A interferência do extrato no biofilme consolidado foi definida pela equação: $DO_{0h} \text{ média} / DO_{24h} \text{ média} \times 100$ (Adaptado de Nostro et al., 2007). Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos três vezes.

3.10. Interação do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado com o biofilme bacteriano em formação

A concentração de 0,25mg/ml de extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado (concentração capaz de inibir o crescimento bacteriano das 136 *Staphylococcus* spp. testadas na CIM₁₀₀ e CBM₁₀₀), foi utilizada sobre o biofilme em formação. Este ensaio foi realizado em microplacas. Os inóculos bacterianos foram cultivados em 10ml de TSB com 1% de glicose a 1%, por 24h a 37°C, sendo 100µl acrescidos nos poços da placa, que previamente havia sido adicionada 100µl do extrato e 100µl de meio de cultura nos controles. Após 24h de incubação a 37°C, as placas foram submetidas à coloração por violeta de genciana. A eficácia do extrato em interferir com a formação do biofilme foi definida pela equação: DO média dos

poços tratados/DO média dos poços controle x 100 (adaptado de Nostro et al., 2007). Foram avaliadas 19 amostras de *Staphylococcus* spp. produtoras de biofilme, coletadas de amostras de piodermatites de cães (16) e gatos (03) no período de 2011 a 2013 na cidade de Petrolina, quanto a interação do biofilme consolidado com o extrato orgânico da *C. substellata* e do ácido úsnico purificado na concentração de 0,25mg/ml. Os ensaios foram realizados em triplicata e repetidos três vezes.

3.11. Identificação fúngica

O cultivo fúngico foi realizado a partir de 85 amostras (Tabela 2) de pelo coletadas das bordas de lesões de pele de cães e gatos com suspeita clínica de dermatofitose, atendidos junto ao Hospital Veterinário da UNIVASF e clínicas particulares de Petrolina (PE), no período de 2011 a 2012 e encaminhadas, imediatamente, até 24h para Laboratório de Microbiologia e Imunologia Animal do Campus de Ciências Agrárias da UNIVASF.

Os pelos dos animais foram submetidos ao exame direto, em microscópio óptico, utilizando KOH a 20%, para observar a existência de eventuais alterações (pelos com dilatações e irregularidades, bem como a presença de artroconídeos), com posterior semeadura das amostras em placas de Petri com meio ágar Sabouraud e/ou meio batata dextrose ágar (BDA) à temperatura de $\pm 25^{\circ}\text{C}$, pelo período de sete a 30 dias. A identificação ocorreu por meio da macromorfologia, com avaliação da pigmentação, textura, consistência e forma do verso e reverso das colônias desenvolvidas, da velocidade de crescimento das mesmas (ASH; ORIHEL, 1990) e através do microcultivo em lâmina. O isolamento das culturas fúngicas identificadas foram coradas com o corante azul de lactofenol, e a observação das estruturas fúngicas foi realizada através da microscopia óptica, seguindo a metodologia de Riddel (1950).

Tabela 2– Amostras de pelo (n=85) da borda de lesões de pele oriundas de cães e gatos com suspeita clínica de dermatofitose na cidade de Petrolina (PE).

| Espécie Animal | Amostra (n ¹) | Período |
|--------------------|---------------------------|-------------|
| Cães ² | 75 | 2011 a 2012 |
| Gatos ³ | 10 | 2012 |

n¹: número de amostras, ²espécie *Canis familiaris*, ³espécie *Felis domesticus*.

3.12. Determinação da atividade antifúngica frente ao extrato orgânico de *C. substellata* e ao ácido úsnico purificado

Para a determinação da atividade antifúngica *in vitro* do extrato orgânico de *C. substellata* e ácido úsnico purificado, foram utilizadas duas amostras *M. canis* e três amostras *M. gypseum*. Uma amostra de *M. gypseum* foi coletada de um gato e as outras amostras foram obtidas de cães. A determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) foi feita de acordo com o documento M38-A (CLSI, 2005), utilizando as concentrações no intervalo de 25mg/ml a 0,0000059mg/ml (1:2) em triplicata.

Após a diluição do extrato orgânico e do ácido úsnico purificado em dimetilsulfóxido de qualidade analítica (DMSO) e RPMI-1640 (1:50), a concentração de 25mg/ml foi diluída em 200µL (1:2) em microplaca de 96 poços em meio RPMI-1640 de acordo com a metodologia descrita no documento M38-A (CLSI, 2005), na qual foi adicionada o inóculo.

Na preparação do inóculo, foram utilizadas para obtenção de uma suspensão em Solução Salina, colônias desenvolvidas em Meio Ágar Saboraud, com turbidez de 0,5 da escala Mac Farland. Destas, foram inoculados 10µL (5×10^4 UFC/ml) em cada poço da microplaca, contendo a diluição do extrato orgânico e do ácido úsnico purificado. O material foi incubado de 25° a 35°C/5 dias, em condições de aerobiose e na sequência foi determinada a CIM₅₀ e CIM₁₀₀, considerando a inibição visual parcial e total do crescimento fúngico. A partir das diluições que não se identificou crescimento fúngico visível, retirou-se uma alíquota de 10µl, semeando-se na superfície de àgar Saboraud e incubando por cinco dias a $\pm 25^\circ\text{C}$. Na sequência, foi determinada a CFM, como a menor concentração do extrato em estudo capaz de causar a morte do inóculo. Os ensaios foram realizados em triplicata (CLSI, 2005).

Como controle positivo foi utilizado o inóculo em meio RPMI-1640, como controle de diluente foi utilizado o DMSO a 1% (sem a droga) em meio RPMI-1640 e como controle negativo o meio RPI-1640. Para controle da viabilidade do inóculo turvado na solução salina, 10µL também foram inoculados em placa de Petri contendo meio àgar Saboraud, onde foi observado o crescimento dos inóculos nas mesmas condições da CIM ($\pm 25^\circ/5$ dias).

3.13. Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o teste exato de Fisher para a análise da correlação entre a produção de biofilme e a presença do gene *icaD* e da relação entre a presença ou ausência do gene *blaZ* quanto a resistência e sensibilidade aos antimicrobianos betalactâmicos (ampicilina, penicilina, amoxicilina+clavulanato e oxacilina) (REIS, 2003). O teste de Wilcoxon foi utilizado para diferenças entre pares ordenados, na comparação do efeito antimicrobiano do extrato orgânico de *C. substelatta* e do ácido úsnico purificado (SAMPAIO, 2007). Todas as análises foram feitas utilizando o Software Estatístico R (R CORE TEAM, 2012).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Origem das amostras

Dos 110 isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de amostras de cães e gatos com suspeita clínica de otite e piodermatite em Petrolina (PE), 11 foram de gatos, sendo 10 de animais sem raça definida (SRD) e um isolado de uma amostra de um gato da raça angorá. Dos isolados de amostras de cães, 77 isolados foram de cães de raça (Figura 4) e 22 isolados de cães SRD.

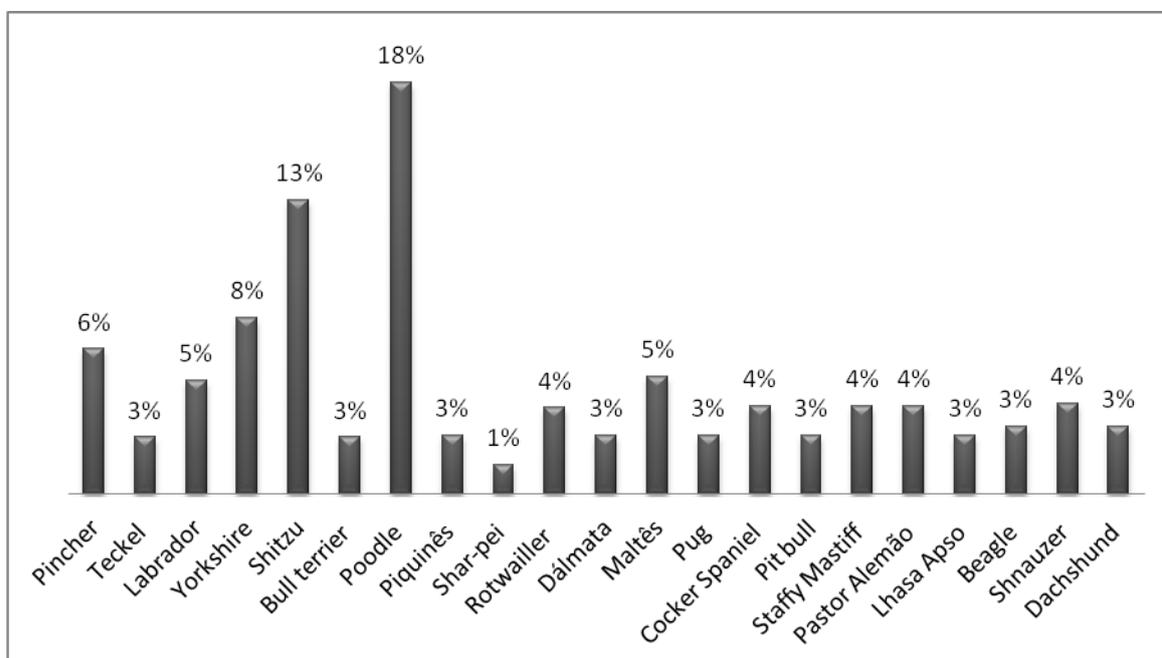


Fig. 4 - Ocorrência de raças caninas com suspeita clínica de piodermatite e otite atendidos na cidade de Petrolina (PE), 2011-2012.

Neste trabalho, das 21 raças avaliadas com suspeita clínica de piodermatite e otite, a ocorrência destas enfermidades foi maior na raça Poodle (18%), seguida pelas raças Shitzu (13%) e Yorkshire (8%). Nos trabalhos de Santos (2007), Oliveira et al. (2005), Leite (2000) e Nobre et al. (2002) eles também encontraram uma ocorrência maior de otite canina na raça Poodle, o que pode estar relacionada a fatores anatômicos da orelha externa nesta raça (fatores predisponentes), pela presença de pelos e menor ventilação auricular, assim como causas alérgicas (raça com maior predisposição), que pode ter o envolvimento de piodermatites e otites secundariamente.

Na avaliação da faixa etária dos animais acometidos com piodermatite e otite, foram distribuídos em três grupos: animais jovens (até um ano de idade), animais adultos jovens (de um a quatro anos de idade) e adultos e senis (acima de quatro anos) (Figura 5).

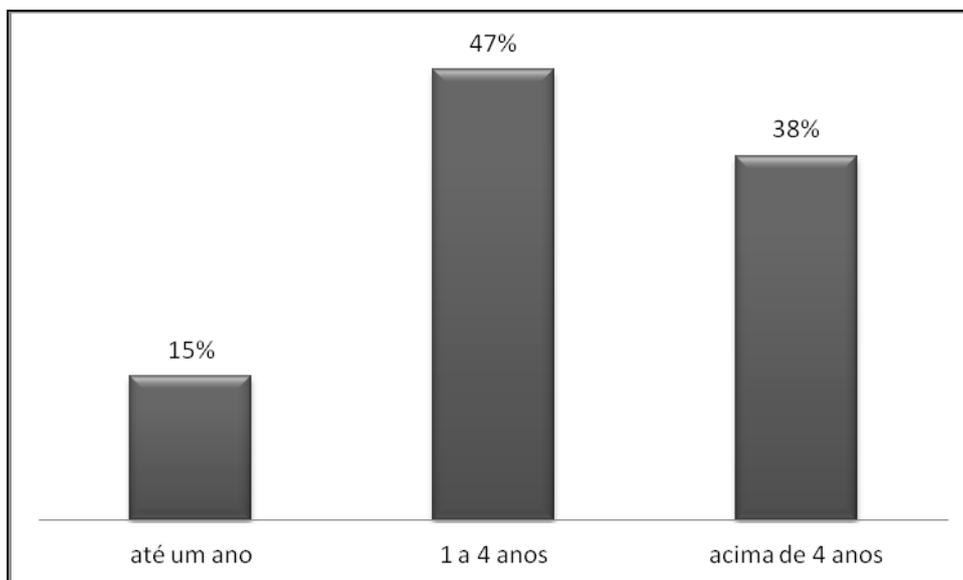


Fig. 5 - Distribuição por idade dos 110 casos de otite e piodermatite em cães e gatos atendidos em Petrolina (PE) – 2011/2012.

Com relação a faixa etária, 47% (52/110) dos animais avaliados possuíam entre um e quatro anos (adultos jovens), valor semelhante ao apresentado no trabalho de Oliveira et al. (2005), com 48,4% de ocorrência em animais acometidos com otite até quatro anos de idade. Santos (2007) relatou um envolvimento maior de otite canina em animais com a faixa etária maior que cinco anos, o que reforça o envolvimento neste trabalho de enfermidades que acometem cães jovens (de um a quatro anos), entre elas as causas alérgicas, que acometem várias espécies, entre elas, *Poodles* e *Shitzus*, que apresentaram maior ocorrência de otite e piodematite no presente trabalho.

Dos 110 isolados de *Staphylococcus* spp. obtidos de amostras de cães e gatos, 56 isolados foram de machos e 54 de fêmeas, não havendo diferença significativa entre os sexos com relação ao acometimento por piodermatite ou otite. Santos (2007) observou uma maior ocorrência de otite canina em cães do sexo masculino (62,4%), mas não correlacionou qual o fator envolvido.

4.2. Identificação bacteriana

Dos 136 isolados de *Staphylococcus* spp., 110 isolados foram obtidos na cidade de Petrolina (PE) e 26 isolados foram cedidos pelo LABAC (UFSM). Sendo identificadas como cocos Gram positivos, catalase positiva e oxidase negativa. Destes, 116 isolados foram coagulase positivas e 20 foram coagulase negativas.

Com a utilização dos testes bioquímicos, foi possível identificar 70 isolados de *S. aureus*, 11 isolados de *S. intermedius*, 46 *Staphylococcus* spp. coagulase positiva e 20 *Staphylococcus* coagulase negativa (Figura 6).

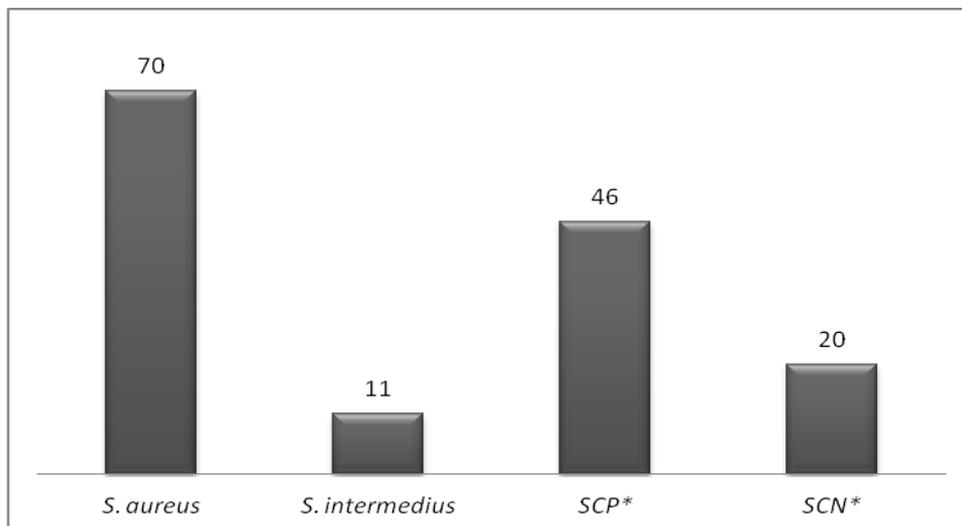


Fig. 6 – Identificação de *Staphylococcus* spp. utilizando os testes bioquímicos: Manitol Salt Agar (MSS), Glicose Salt Ágar (GSS), Púrpura Ágar Base (PAB), Urease e Dnase.* SCP: *Staphylococcus* Coagulase Positiva. *SCN: *Staphylococcus* Coagulase Negativa.

Na identificação genotípica, com a utilização da técnica de PCR para análise dos genes *nuc* e *rdr*, relacionados à identificação da espécie de *S. aureus* e *S. epidermidis*, respectivamente, 119 isolados foram identificadas como sendo *S. aureus*, e os 136 isolados foram negativas para o gene *rdr* na identificação da espécie de *S. epidermidis*, restando cinco isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva e um isolado de coagulase negativa sem identificação de espécie.

Dos 119 isolados identificados como *S. aureus* na PCR, pela detecção do gene *nuc*, 18 foram coagulase negativa e seis foram DNase negativa nos testes bioquímicos, impossibilitando a identificação dos mesmos como sendo *S. aureus*,

utilizando apenas os testes bioquímicos mencionados. Dessa forma, demonstrando a maior sensibilidade e especificidade da técnica de PCR na identificação de *S. aureus* em comparação aos testes bioquímicos utilizados.

Dentre os 136 isolados de *Staphylococcus* spp., 87,5% foram identificadas como sendo *S. aureus* e 8% foram identificadas como sendo *S. intermedius*. Segundo Frank et al. (2003), *S. aureus* é predominante nos seres humanos, enquanto que *S. intermedius* e *S. schleiferi* são predominantes em cães. O que não foi encontrado nesse trabalho que teve como espécie predominante em piodermatites e otites de pequenos animais, *S. aureus*. Dos 50 isolados de otite, 49 foram obtidas de cães, e destes, 6% foram *S. intermedius* e o restante *S. aureus*, o que não concorda com os resultados de Cole et al. (1998) e Lilenbaum et al. (2000) que demonstraram *S. intermedius* como uma das principais bactérias isoladas de otopatias em cães.

A transmissão zoonótica de cepas de *Staphylococcus* spp. em animais de companhia para o homem já é descrita na literatura (TANNER et al., 2000; CIZMAN, 2003; KIKUCHI; OHSHIMA, 2004; OLIVEIRA et al., 2005), o que possibilita que também possa ocorrer uma migração bacteriana inversa, do homem para o animal, em virtude da proximidade dos animais de companhia com seus proprietários, o que poderia justificar a ocorrência de *S. aureus* nas amostras obtidas de piodermatite e otite em animais de companhia neste trabalho. Na possível transmissão zoonótica cruzada dessas cepas, deve-se levar em consideração a ocorrência de cepas de MRSA, pois este fato requer uma monitoração nos perfis de isolamento e susceptibilidade aos antimicrobianos, tanto na prática veterinária como na medicina humana (OLIVEIRA et al., 2005).

Dos *S. aureus* identificados na PCR, 15% foram negativos no teste de coagulase, o que segundo Koneman et al. (1997) é possível, pois raras cepas de *S. aureus* podem ser coagulase negativa. Seis dos isolados de *S. aureus* identificados na PCR foram negativos no teste de DNase, o que também foi relatado por Rao et al. (2002) e Kateete et al. (2010). Para os outros testes bioquímicos utilizados: manitol semi sólido, glicose semi sólida, purple ágar base maltose, urease, catalase e oxidase, não houve divergência de resultados quando comparados com os resultados da PCR, para identificação de *S. aureus*.

A técnica de PCR foi mais sensível e específica na identificação de *S. aureus* (com amplificação do gene *nuc*), quando comparada aos testes bioquímicos

utilizados, em especial o teste de coagulase e DNase, na identificação de espécies de *Staphylococcus* spp.

4.3. Teste de sensibilidade aos antimicrobianos

4.3.1. Teste fenotípico

No teste de sensibilidade aos antimicrobianos (Figura 7), das nove classes de antimicrobianos testadas (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, quinolonas, macrolídeos, sulfonamidas, tetraciclina, cefalexinas, lincosamidas e alfenicóis), 32% (44/136) dos isolados foram resistentes a mais de quatro classes de antimicrobianos, 10% (13/136) isolados foram resistentes a três classes, 16% (22/136) isolados apresentaram resistência a dois grupos, 19% (26/136) isolados foram resistentes a um grupo de antimicrobiano e 23% (31/136) isolados foram sensíveis a todos os grupos de antimicrobianos testados.

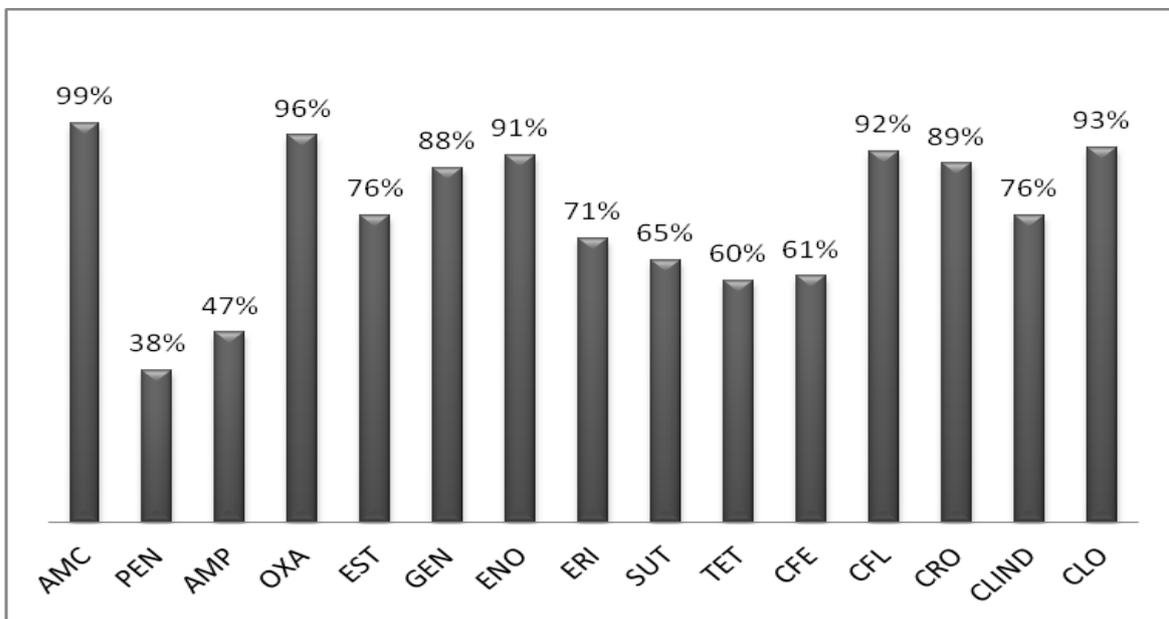


Fig. 7- Eficiência dos antimicrobianos testados frente aos 136 isolados de *Staphylococcus* spp. AMC (30 μ g): amoxicilina com ácido clavulânico, PEN (10 μ g): penicilina, AMP (10 μ g): ampicilina, OXA (1 μ g): oxacilina, EST (10 μ g): estreptomicina, GEN (10 μ g): gentamicina, ENO (5 μ g): enrofloxacina, ERI (15 μ g): eritromicina, SUT (25 μ g): Sulfametaxona, TET (30 μ g): tetraciclina, CFE (30 μ g): cefalexina, CFL (30 μ g): cefalotina, CRO (30 μ g): ceftriaxona, CLIND (2 μ g): clindamicina, CLO (30 μ g): clorafenicol.

Dos 136 isolados, 70 apresentaram resistência a mais de dois antimicrobianos do grupo dos β -lactâmicos (ampicilina, penicilina, amoxicilina com ácido clavulânico e oxacilina) (IRMA $\geq 0,5$), 13 isolados apresentaram resistência apenas à penicilina, duas à ampicilina e 51 amostras foram sensíveis a todos os antimicrobianos testados *in vitro*. Os isolados apresentaram maior resistência frente aos β -lactâmicos, com sensibilidade de 37% (50/136), sendo que dentro deste grupo, a amoxicilina associada ao clavulanato de potássio e à oxacilina apresentou eficiência superior a 96%.

Por outro lado, os grupos antimicrobianos que apresentaram maior sensibilidade frente aos isolados testados, foram os alfenicóis, quinolonas e cefalexinas, com sensibilidade igual ou superior a 80% (109/136) frente aos *Staphylococcus* spp. Meng et al. (1998), citaram em seu trabalho que a resistência aos fármacos pode estar relacionada com o uso excessivo de antimicrobianos, o que pode explicar a alta resistência ao grupo dos beta lactâmicos, que são utilizados rotineiramente na clínica médica veterinária, tanto em enfermidades que envolvem o trato respiratório, ortopédico, urinário, respiratório e dermatológico.

A baixa resistência dos isolados frente às quinolonas também foi descrita em outros trabalhos (JUNCO; BARRASA, 2002; HOEKSTRA; PAULTON, 2002). Junco e Barrasa (2002) alertaram que o uso indiscriminado de fluoroquinolonas, em especial a enrofloxacina, pode resultar em aumento na resistência bacteriana. Quanto à sensibilidade ao grupo das cefalosporinas, resultados semelhantes foram descritos por outros autores, os quais relatam susceptibilidade às cefalosporinas em mais de 90% das cepas de *Staphylococcus* spp. isoladas de animais de companhia (BORNAND, 1992; COLE et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2006; SANTOS, 2007). A sensibilidade dos *Staphylococcus* spp. ao clorafenicol em mais de 80%, também é relatada por Oliveira et al. (2000) e Batista et al. (1998), já no trabalho de Vandžurová et al. (2013) foram descritos isolados de *S. nepalensis* resistentes ao clorafenicol.

4.3.2. Teste genotípico

Dos 136 isolados de *Staphylococcus* spp. avaliados pela PCR, 32% (44/136) dos isolados foram positivos para o gene *blaZ*, sendo identificados 40 *S. aureus*, três *S. intermedius* e um *Staphylococcus* coagulase positiva (Figura 8). Todos foram

negativos para amplificação do gene *mecA*. O teste exato de Fisher não identificou correlação entre presença do gene *blaZ* e a resistência *in vitro* aos antimicrobianos do grupo betalactâmicos (REIS, 2003).

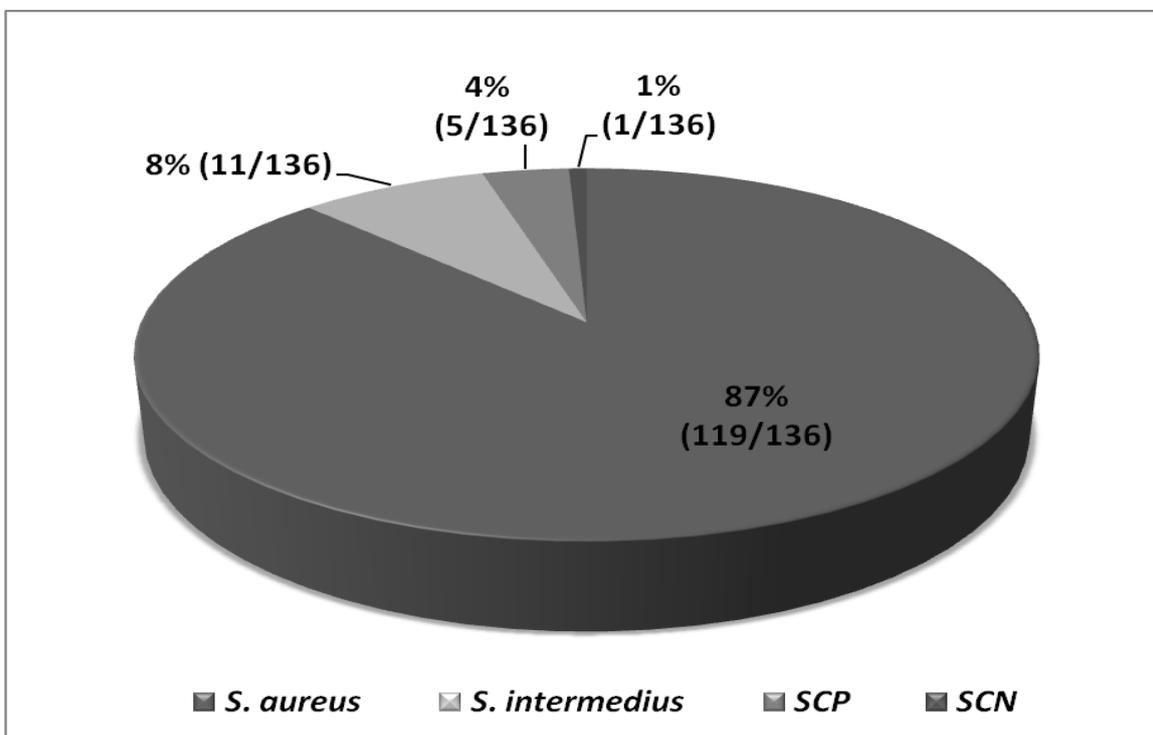


Fig.8- Distribuição da presença do gene *blaZ* (44/136) nas espécies de *Staphylococcus* spp. isoladas de cães e gatos com suspeita clínica de piodermatite e otite no estado de Pernambuco e Rio Grande do Sul, 1990-2012.

Nos isolados que foram positivos para o gene *blaZ*, é possível a presença do mecanismo de resistência bacteriano com a produção de β -lactamases, enzimas que destroem hidroliticamente β -lactâmicos (FUDA et al., 2005), local onde os antimicrobianos β -lactâmicos se ligam às PBPs bacterianas e que exercem o efeito antimicrobiano (OLIVEIRA, 2011).

Neste trabalho foi possível identificar um número elevado de *Staphylococcus* spp., resistentes aos antimicrobianos do grupo β -lactâmicos e com a presença do gene *blaZ*, confirmada pela PCR. Valores estes, maiores que os encontrados por Schlotter et al. (2013), que detectaram 11,1% (21 amostras de isolados de leite bovino) de *Staphylococcus* spp. resistentes à penicilina *in vitro* e positivos na PCR para o gene *blaZ*. Livorsi et al. (2012) isolaram 77% de *S. aureus* (corrente sanguínea humana) resistentes ao grupo dos β -lactâmicos, embora sensíveis à

meticilina (Methicillin-Sensitive *Staphylococcus aureus* - MSSA), e que possuíam o gene *blaZ*, confirmado pela técnica de PCR.

Dos isolados positivos para o gene *blaZ*, 12 foram sensíveis ao grupo dos β -lactâmicos *in vitro*, 32 amostras foram multirresistentes (penicilina e ampicilina). Destas, uma amostra *S. aureus* foi resistente também à amoxicilina associada com clavulanato de potássio, sendo que o ácido clavulânico se liga irreversivelmente às β -lactamases e inibe o seu efeito (OLIVEIRA, 2011). Isso demonstra a possibilidade de que outro fator de resistência possa estar envolvido além da presença do gene *blaZ* e da produção de β -lactamases. A presença do gene *mecA*, também foi negativa nessa amostra, reforçando envolvimento de outro/outros genes de resistência que não incluem o gene *mecA*, bem como outros mecanismos de resistência que possam estar envolvidos.

Um dos isolados de *S. aureus* multirresistentes (positivo para o gene *blaZ*), foi resistente a oxacilina *in vitro*, e negativo para o gene *mecA*. Embora AARESTRUP et al. (2001), descrevam que a modificação das PBP's, sintetizadas pelo gene *mecA*, é um dos principais mecanismos de resistência descritos frente a oxacilina, existem outros genes que não foram avaliados neste trabalho, e que podem ser os responsáveis pela resistência apresentada. Entre eles, a presença do cassete cromossômico *SCCmec* (HIRAMATSU, 1995), responsável pelo transporte dos genes *mecA* (KATAYAMA et al., 2000), e a presença dos genes *mecI-mecR1*, responsáveis pelo controle transcricional de *mecA* (OLIVEIRA, 2011), entre outros genes e/ou mecanismos de resistência que possam estar envolvidos na resistência à oxacilina encontrada neste trabalho.

Dos 136 isolados, cinco (4%) foram resistentes a oxacilina *in vitro*, sendo três isolados de *S. aureus*, uma amostra coagulase positiva e uma amostra coagulase negativa; todavia, nenhuma amostra foi positiva para o gene *mecA*. Apenas uma delas foi positiva para o gene *blaZ* e apresentou resistência a todos os grupos de antimicrobianos testados.

Bemis et al. (2006) compararam alguns testes para determinar a resistência a oxacilina e detecção do gene *mecA*, e tanto para PCR quanto para testes de difusão em disco mostraram-se satisfatórios para a determinação da resistência em isolados de *S. aureus* obtidos de hospedeiros caninos.

Oliveira (2011) afirmou que MRSA é intrinsecamente uma resistência cruzada a praticamente todos os antimicrobianos β -lactâmicos. Neste trabalho, nenhuma das

amostras que apresentaram essa resistência foi positiva ao gene *mecA*, sugerindo presença de outro(s) mecanismos de resistência, possivelmente associado com BORSA, que pode ocorrer pela hiperprodução de beta-lactamases (PERILLO et al., 2012). Isto pode justificar a resistência à amoxicilina associada com clavulanato de potássio apresentada por uma das amostras de *S. aureus*.

Os isoados que foram resistentes à oxacilina e foram negativos para o gene *mecA*, podem ser produtores de meticilinase, já que foram inibidos pelo ácido clavulânico, ou, ainda, possuir outros fatores de resistência, como a presença de PLPs mutantes (BORSA), entre outros mecanismos de resistência ligados a oxacilina.

Em outros trabalhos foi relatada a prevalência do gene *mecA* em *Staphylococcus* spp. multirresistentes que demonstraram resistência *in vitro* à oxacilina, sendo de 42% (COELHO et al., 2007), 57,6% (DUIJKEREN et al., 2004), e 99% (GRISOLD et al., 2002). No trabalho de Schlotter et al. (2013) somente quatro isolados (2,1%), apresentaram a presença do gene *mecA*, embora demonstrassem resistência à oxacilina *in vitro*. Frey et al. (2013) descreveram que 9,7% dos isolados foram resistentes à oxacilina e essa resistência foi atribuída a presença do gene *mecA*, sendo que o mesmo foi detectado em *S. fleurettii*, *S. epidermidis*, *S. haemolyticus* e *S. Xylosus*, e a resistência à penicilina foi atribuída a presença do gene *blaZ*.

Kawakami et al. (2010) detectaram o gene *mecA* em 66,5% (113/170) de *S. pseudintermedius* e 30,0% (6/20) de *S. schleiferi* isoladas de cães com pioderma no Japão, sugerindo um elevado nível de resistência à meticilina. Ghidini et al. (2011) em seu trabalho com *Staphylococcus* spp. isolados de lesões de pele em cães na Itália, encontraram 28 cepas de estafilococos resistentes à meticilina e/ou oxacilina, com a confirmação da expressão do gene *mecA* em 14 amostras.

Oliveira (2011) afirma uma necessidade de maiores observações quanto a existência de fatores ainda não identificados e determinantes adicionais envolvidos no controle da transcrição do gene *mecA*, apontando para uma revisão do mecanismo de *mecA* regulamentar em cepas de MRSA contemporâneos.

O uso indiscriminado de antimicrobianos de amplo espectro de ação bacteriana, como os β -lactâmicos, quinolonas, cefalexinas e sulfas, tanto na medicina veterinária como humana, tem se intensificado seja através da automedicação frente às farmácias humanas ou na medicina veterinária com o

direcionamento dos animais aos balcões agropecuários, sem supervisão médica e médica veterinária. Por isso, uma preocupação maior ao controle de venda de antimicrobianos na farmácia humana, o que não é uma realidade ainda na área veterinária, potencializando um número cada vez maior de bactérias resistentes na comunidade.

A relação de proximidade e intimidade que o homem estabeleceu com os animais, em especial, os animais de companhia (cães e gatos), possibilita a circulação de cepas resistentes entre as espécies: humana e animal, fazendo destes, uma fonte de infecção inter e entre espécies. Por isso, a importância da prudência no uso de fármacos antimicrobianos, tanto na área médica humana quanto veterinária. A utilização deve ser sempre realizada sob orientação médica e médica veterinária, com o apoio laboratorial, isolamento bacteriano e determinação da sensibilidade *in vitro* das bactérias frente aos antimicrobianos disponíveis.

4.4. Caracterização da produção de biofilme em isolados de *Staphylococcus* spp.

4.4.1. Caracterização fenotípica da produção de biofilme bacteriano

Dentre os 136 isolados avaliados quanto à produção de biofilme pela técnica quantitativa da formação de biofilme em microplacas, 57% (78/136) foram classificados como fortemente aderentes, 10% (13/136) como moderadamente aderentes, 16% (22/136) como fracamente aderentes e 17% (23/136) foram classificados como não aderentes. A formação do biofilme proporciona às bactérias proteção contra a desidratação, colonização por bacteriófagos, fagocitose e também favorece a resistência aos antimicrobianos (GILBERT et al., 2003; ZHAO et al., 2008), sendo que 83% das bactérias isoladas foram produtoras de biofilme, e pode ter nessa característica um mecanismo de resistência importante, que impede a ação do fármacos utilizados rotineiramente no controle antimicrobiano.

No trabalho de Yeon-Soo et al. (2008) foi destacada a importância para a saúde pública do envolvimento dos *Staphylococcus* spp. isoladas a partir de animais e do ar do ambiente, com capacidade de formação de biofilme, principalmente no controle biológico, pela alta capacidade de contaminação de isolado *Staphylococcus*

spp. produtoras de biofilme, oriundos da pele e orelha de cães e gatos em contato direto com o ser humano.

4.4.2. Caracterização genotípica da produção de biofilme bacteriano

Os 136 isolados de *Staphylococcus* spp. foram analisados quanto à presença do gene *icaD*, que pode estar relacionada com a produção de biofilme, sendo observadas três (2%) isolados positivos para o gene *icaD*, um deles, *S. aureus* fracamente aderente no teste fenotípico e dois *S. aureus* classificadas como fortemente aderente na análise fenotípica quantitativa em microplacas de poliestireno. O teste exato de Fisher não identificou correlação entre presença do gene *icaD* e a produção de biofilme pelos isolados de *Staphylococcus* spp. (REIS, 2003).

Arciola et al. (2001) encontraram a presença do gene *icaD* em 61% das 23 amostras de *S. aureus* isoladas de humanos, número maior ao encontrado neste trabalho. Eftekhar e Speert (2009), relataram que o operon *icaADBC*, no qual está incluso o gene *icaD*, não pode ser usado como uma indicação para o fenótipo de biofilme. Uma vez que, as condições de crescimento bacteriano desempenham um papel importante na formação ou não formação do biofilme por outros mecanismos de expressão PIA, que não estão associados ao gene *icaD*. Isto pode auxiliar a justificar os resultados encontrados, onde dos 83% das bactérias apontadas como produtoras de biofilme, pelo teste de análise quantitativa da formação de biofilme em microplacas, 2% foram positivas para a presença do gene *icaD*.

4.5. Determinação da atividade antibacteriana do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado

A concentração de 0,0019mg/ml tanto para o ácido úsnico purificado como para o extrato orgânico de *C. substellata*, foi a concentração que inibiu o crescimento da maioria das amostras de *Staphylococcus* spp. (Figura 9). A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) para as 136 amostras oscilaram entre 0,25mg/ml-0,0019mg/ml, com uma média de 0,0796mg/ml tanto para o extrato orgânico de *C. substellata* como para o ácido úsnico purificado, com 100% de atividade antimicrobiana para os 136 isolados.

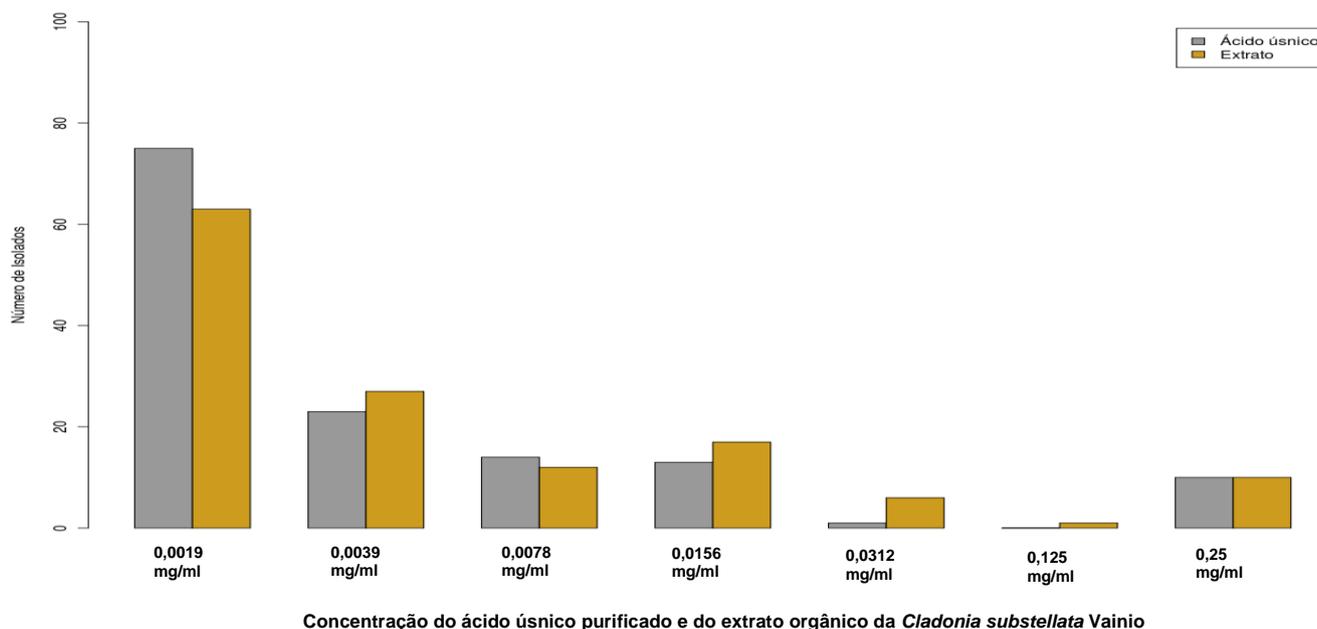


Fig. 9 – Comparação do efeito antimicrobiano do extrato da *Cladonia substellata* Vainio e do ácido úsnico purificado, nas diferentes concentrações (mg/ml) utilizadas para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM), de acordo com o teste estatístico de Wilcoxon (SAMPAIO, 2007).

Na comparação do efeito antibacteriano do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado sobre o *Staphylococcus* spp., não houve diferença significativa, quando da utilização do teste de Wilcoxon (SAMPAIO, 2007). Isto pode ser explicado pela composição do extrato orgânico de *C. substellata*, oriundo do nordeste brasileiro, ter aproximadamente 98% de ácido úsnico em sua composição (HUOVINEN; AHTI, 1986; AHTI et al., 1993; YANO-MELO et al., 1999) e que demonstrou ser o principal responsável pela atividade antimicrobiana encontrada neste trabalho e também em outros trabalhos (BURKHOLDER et al., 1944; CARRAZZONI, 1975; HUOVINEN; AHTI, 1986; AHTI et al., 1993; LAUTERWEIN et al., 1995; PEREIRA et al., 1997; HONDA; VILEGAS, 1998; YANO-MELO et al., 1999; DONLAN, 2001; FALCÃO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2006; MOURA et al., 2008).

Rankovic et al. (2012) testaram a atividade antibacteriana do ácido úsnico comparada à estreptomicina para as bactérias *Bacillus mycoides* (ATCC 6462), *B. subtilis* (ATCC 6633), *S. aureus* (ATCC 25923), *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), e foi observado que o ácido úsnico obteve uma atividade semelhante ou mais forte do que os isolados testadas com

estreptomicina. As concentrações inibitórias mínimas frente *Staphylococcus* spp. ficaram entre 0,0008mg/ml-0,5mg/ml e frente *S. aureus* (ATCC 25923) a concentração de 0,125mg/ml, valor que se enquadra dentro da faixa encontrada neste trabalho que foi de 0,0019mg/ml a 0,25mg/ml (frente os 136 isolados de *Staphylococcus* spp. testados).

Manojlović et al. (2012) determinaram concentrações inibitórias mínimas contra *B. mycoides* (ATCC 6462), *B. subtilis* (ATCC 6633), *S. aureus* (ATCC 25923), *E. coli* (ATCC 25922) e *K. pneumoniae* (ATCC 13883) com valores entre 0,015 mg/ml a 1mg/ml, e também encontrou a concentração de 0,125mg/ml para *S. aureus* (ATCC 25923). Honda et al. (2010) determinaram como concentração inibitória mínima do ácido úsnico contra *Mycobacterim tuberculosis*, o valor de 0,625mg/ml.

Gupta et al. (2012), determinaram a concentração inibitória mínima (CIM) do L-(-)-ácido úsnico contra os isolados clínicos de MRSA, a cepa de referência *S. aureus* MTCC-96 (SA-96), onde encontrou a faixa de inibição de 25mg/ml a 50mg/ml. Esses valores são bem maiores do que os encontrados no presente estudo, e nos trabalhos de Manojlović et al. (2012) e Honda et al. (2010).

Gupta et al. (2012) demonstraram que a atividade antimicrobiana do ácido úsnico contra MRSA ocorre pela ruptura da membrana celular. Ainda pôde demonstrar que o ácido úsnico é seguro quanto a sua toxicidade, com testes realizados em camundongos na concentração de até 100mg/kg.

Segatore et al. (2012) avaliaram o ácido úsnico em combinação com antimicrobianos e observaram o sinergismo do ácido úsnico em associação com a gentamicina, o antagonismo com a levofloxacina, a indiferença quando em associação com a eritromicina e variabilidade quando associado com a clindamicina e oxacilina, descrevendo o ácido úsnico como um bom candidato antimicrobiano, assim como a sua utilização em combinação com outros medicamentos já utilizados comercialmente.

4.6. Interação do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado com o biofilme de *Staphylococcus* spp. consolidado, em formação e a sua relação com a CIM e CBM

Dos 19 isolados de *Staphylococcus* spp. produtores de biofilme (Tabela 3), um isolado foi classificado como *Staphylococcus* coagulase positiva; dois *Staphylococcus* coagulase negativa; dois *S. intermedius* e 14 *S. aureus*. Eles foram avaliados quanto à interação do biofilme bacteriano em formação e já consolidado com o extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado.

Tabela 3- Interação do extrato orgânico de *Cladonia substellata* Vainio e do ácido úsnico purificado, com o biofilme em formação e já consolidado dos *Staphylococcus* spp. avaliados, ambos na concentração de 0,25mg/ml.

| Extrato/Fração | % (n) Inibição do biofilme em formação | % (n) Inibição do biofilme consolidado |
|------------------|----------------------------------------------|----------------------------------------------|
| Extrato orgânico | 42 (8/19) | 47 (9/19) |
| Ácido úsnico | 37(7/19) | 58 (11/19) |

Foi realizada também a determinação da atividade antibacteriana (CIM e CBM) do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado, frente aos 19 isolados de *Staphylococcus* spp. produtores de biofilme (um *Staphylococcus* coagulase positiva, dois *Staphylococcus* coagulase negativa, dois *S. intermedius* e 14 *S. aureus*) e 23 isolados de *S. aureus* não produtoras de biofilme (Tabela 4), e pôde-se observar que tanto o extrato orgânico da *C. substellata*, quanto o ácido úsnico purificado, tiveram ação antimicrobiana em menores concentrações (0,65mg/ml–0,42mg/ml) frente as bactérias produtoras de biofilme em relação às não produtoras de biofilme (2,52mg/ml-2,71mg/ml).

Tabela 4- Média da concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) do extrato orgânico de *Cladonia substellata* Vainio e do ácido úsnico purificado, sob *Staphylococcus* spp. produtores de biofilme (19 isolados) e *Staphylococcus* spp. não produtores de biofilme (23 isolados) em microplacas de poliestileno com 96 poços.

| Extrato/Fração | Média da CIM e CBM <i>Staphylococcus</i> spp. produtores de biofilme | Média da CIM e CBM sob <i>Staphylococcus</i> spp. não produtores de biofilme |
|------------------|----------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------|
| Extrato orgânico | 0,65mg/ml | 2,52mg/ml |
| Ácido úsnico | 0,42mg/ml | 2,71mg/ml |

O extrato orgânico de *C. substellata* e o ácido úsnico purificado, ambos na concentração de 0,25mg/ml, inibiram o biofilme em formação em mais de 37% das amostras de *Staphylococcus* spp. avaliadas, e interagiram com o biofilme já consolidado, diminuindo ou destruindo-o em mais de 47% dos isolados avaliados. Chifiriuc et al. (2009) avaliando *in vitro* a inibição da produção do biofilme na placa dentária pelo ácido úsnico, observaram que o ele inibiu seletivamente o desenvolvimento do biofilme de bactérias Gram positivas e também suas propriedades hemolíticas, demonstrando a interferência do ácido úsnico com a intra e interrelação bacteriana e mecanismos de sinalização, baseados no *quorum sensing* e resposta dependente da densidade de células bacterianas, indicando-o como um princípio ativo para uma nova fórmula terapêutica, destinada a prevenção e tratamento de patologias gengivais e periodontais.

Kim et al. (2011) também avaliaram a inibição do biofilme pelo ácido úsnico, e efeitos mecânicos, eficácia antimicrobiana e citotoxicidade desse composto, indicando-o como um antimicrobiano eficaz, e capaz de ser utilizado na profilaxia da produção de biofilme por *Staphylococcus* spp. Franconi et al. (2004) demonstraram em seu trabalho, a capacidade de (+)-ácido úsnico em controlar a formação do biofilme em bactérias *S. aureus* e *P. aeruginosa* em condições de fluxo laminar por meio de análise de imagem. Os polímeros de (+)-ácido úsnico carregados não inibiram a ligação celular inicial dos *S. aureus*, mas mataram as células ligadas resultando na inibição da produção do biofilme. Em relação à bactéria *P. aeruginosa*, utilizando os mesmos polímeros de (+)-ácido úsnico carregados, verificaram a formação de biofilme na superfície laminar, mas a morfologia do biofilme foi alterada,

possivelmente indicando que o (+)-ácido úsnico possa interferir com as vias de sinalização bacteriana e assim inibir ou modificar a produção de biofilme bacteriano.

Pompilio et al. (2013) avaliaram o ácido úsnico *in vitro*, quanto a sua atividade antibacteriana e antibiofilme contra três isolados MSSA e três isolados MRSA de pacientes humanos com fibrose cística, e concluíram que o ácido úsnico possui atividade contra células planctônicas, sendo ativo contra MRSA, e com capacidade de inibir a pré formação do biofilme.

Grumezescu et al. (2011) também avaliaram a atividade antibiofilme do ácido úsnico, incorporado a nanopartículas, e mostraram que as mesmas podem ser utilizadas como agentes de revestimento em diferentes dispositivos médicos, com o intuito de impedir a formação de biofilme bacteriano, inclusive em pacientes com fibrose cística. Neste trabalho, tanto o extrato orgânico de *C. substellata*, como o ácido úsnico, inibiram a formação de biofilme, o que pode ter acontecido pela morte bacteriana. O ácido úsnico e o extrato orgânico de *C. substellata*, que tem o ácido úsnico em mais de 90% da sua composição, inibiu o biofilme já consolidado dos *Staphylococcus* spp., podendo o ácido úsnico também ter mecanismos que interajam diretamente com o biofilme bacteriano já consolidado.

Foi possível determinar a atividade antimicrobiana através da morte e/ou inibição bacteriana (CIM e CBM), além de quantificar a interação do ácido úsnico diretamente com o biofilme bacteriano (em formação e já consolidado), onde apresentou melhor ação antimicrobiana frente aos *Staphylococcus* spp. produtores de biofilme, sendo necessárias concentrações menores de ácido úsnico na inibição do crescimento bacteriano, quando comparado com *Staphylococcus* spp. não produtores de biofilme. Isto potencializa sua ação, em virtude do biofilme não impedir seu mecanismo de ação, o potencializando. Levando em conta que a formação do biofilme proporciona às bactérias resistência aos antimicrobianos (GILBERT et al., 2003; ZHAO et al., 2008) e tem sido uma das preocupações quando da busca por novos antimicrobianos. O ácido úsnico demonstrou grande potencial na sua utilização como fármaco e/ou coadjuvante farmacológico.

4.7. Identificação fúngica

Das 85 amostras de pelo de borda de lesões de pele de cães e gatos com suspeita clínica de dermatofitose, foram isolados fungos filamentosos em 40 (47%)

delas, sendo quatro *Alternaria* sp., 24 *Aspergillus* sp., dois *Fusarium* sp., um *Penicillium* sp., dois *Microsporium canis*, 10 *M. gypseum* e três *Trichophyton* sp. (Figura 10). No total 18% (15/85) de dermatófitos foram isolados neste trabalho.

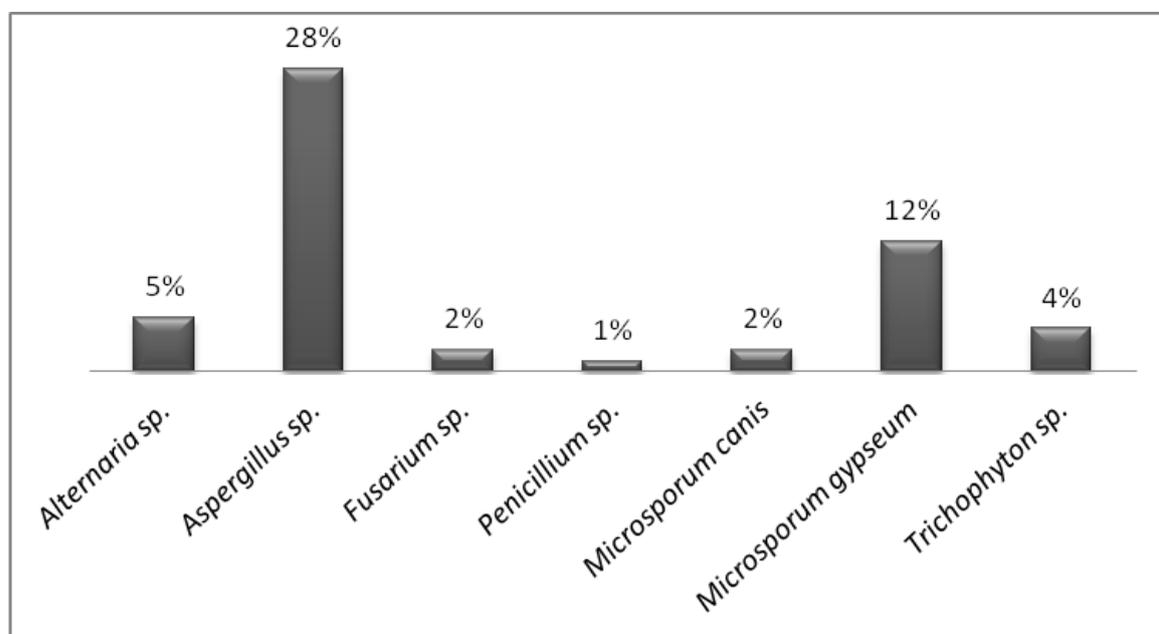


Fig. 10 - Distribuição dos 40 fungos filamentosos isolados das 85 amostras de pelo de lesões de pele suspeitas de dermatofitose em cães e gatos. Petrolina (PE), 2011-2012.

A ocorrência de dermatófitos em cães com dermatopatias diversas varia de 12,5% a 24,6% (AL-DOORY et al., 1968; BONE, 1971; PINARD et al., 1987) valor similar (18%) ao encontrado neste trabalho, e também ao encontrado por outros autores, como Cafarchia et al. (2006), que isolaram 20,5% (28/136) dermatófitos em cães e 28,2% (70/248) em gatos (cujos proprietários foram diagnosticados com tinea corporis) e Chah et al. (2012), que identificaram 13% de amostras positivas para dermatófitos de 46 amostras de animais domésticos (cães, caprinos, ovinos e suínos) com suspeita clínica de dermatofitose.

Machado et al. (2004) na avaliação de 250 amostras de pele de cães, verificaram que 73,7% tinham como agente etiológico *M. canis* e 26,3% *M. gypseum*. Neste trabalho foi possível isolar 2% (dois isolados) de *M. canis* e 12% (10 isolados) de *M. gypseum*, valores bem diferentes ao encontrado na literatura, que geralmente aponta uma maior ocorrência do fungo zoofílico *M. canis* como principal agente etiológico envolvido nas dermatofitoses (MACIEL, 2005; MACHADO et al., 2004; FRASER, 2003) e não o fungo geofílico *M. gypseum*, que

pode ocorrer em virtude da contaminação do ambiente (HOSKINS, 1997; MORAILLON, 2004).

Zaror e Moreno (1986) isolaram 88,46% de *M. canis* de 104 gatos hígidos e 7,93% de *M. canis* de 126 cães hígidos, mostrando a importância destes animais no ciclo epidemiológico de *M. canis* em humanos, uma vez que estes animais podem funcionar como hospedeiros assintomáticos. Cafarchia et al. (2004) isolaram *M. canis* como dermatófito em maior frequência nos cães e gatos (77,7%), seguido por espécies de dermatófitos geofílicos (*M. gypseum*, *T. terrestre*). Seker et al. (2011) isolaram 18,7% dermatófitos de cães (n=198) e 20,1% de gatos (n=164) na Turquia, sendo 57,1% de *M. canis*. Cabañes (2000) descreve que nos cães com suspeita de dermatofitose, com poucas exceções, o *M. canis* é a espécie mais comumente isolada, sendo *T. mentagrophytes* e *M. gypseum* menos frequentes.

No entanto, neste trabalho foi encontrada uma maior ocorrência de *M. gypseum* quando comparado ao *M. canis* em lesões sugestivas de dermatofitoses em cães e gatos, sugerindo uma contaminação ambiental, uma vez que estes fungos são geofílicos e podem estar naturalmente presente em solos, ou ainda estar presente em ambientes onde esses animais circulem, como banhos e tosas, clínicas veterinárias, a área de passeio ou ambiente domiciliar.

Drouot et al. (2009) identificaram dermatófitos em cães e gatos, e revelaram, que além de *M. canis*, duas espécies diferentes do complexo *T. mentagrophytes* (*Arthroderma benhamiae* e *A. vanbreuseghemii*) foram isolados, sendo que, 93% dos gatos tinham contato com a rua, e possivelmente com roedores, que são os portadores de *A. vanbreuseghemii*. E entre os gatos com lesões de pele, que ficavam estritamente dentro de casa, foram isolados exclusivamente *M. canis*. Demonstrando a importância de roedores no ciclo zoonótico das dermatofitoses, o que não foi encontrado neste trabalho, mas atenta para cuidados com possíveis fontes de contaminação, seja pelo contato direto ou pelo ambiente.

Na avaliação direta do pelo, foi possível observar irregularidades nas bordas dos pelos em 29 amostras. Destas, 18 foram positivas para fungos filamentosos, entre elas, 15 amostras positivas para dermatófitos (*M. canis*, *M. gypseum* e *Trichophyton* sp.), sendo 7% (1/15) em gatos e 93% (14/15) em cães (Tabela 5).

Tabela 5 - Relação entre os resultados do exame microscópico direto e cultivo fúngico na identificação de dermatófitos, de amostras de pelo de cães e gatos com suspeita clínica de dermatofitose em Petrolina (PE), 2011-2012.

| Metodologia | Cães n= 75 (100%) | Gatos n= 10 (100%) | Total n= 85 (100%) |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Exame direto | 27 (36) | 02 (20) | 29 (34) |
| Cultivo fungico | 14 (19) | 01(10) | 15 (18) |
| Dermatófitos | <i>Microsporum gypseum</i> (n= 9) <i>Microsporum canis</i> (n=2) <i>Trichophyton</i> spp. (n= 3) | <i>Microsporum gypseum</i> (n=1) | <i>Microsporum gypseum</i> (n= 10) <i>Microsporum canis</i> (n=2) <i>Trichophyton</i> spp. (n= 3) |

Cafarchia et al. (2004) coletaram amostras de 424 animais (268 cães e 156 gatos), com lesões cutâneas (alopecia e descamação periférica), entre 1999 e 2002. Sendo que 99 (23,3%) foram positivas para dermatófitos na cultura fúngica (20,5% de cães e 28,2% de gatos), demonstrando uma ocorrência semelhante à encontrada em cães (19%) neste trabalho e uma maior frequência em gatos quando comparado ao encontrado (10%), considerando-se a cultura para o isolamento fúngico.

Seker e Dogan (2011) descreveram a ocorrência de dermatófitos em cães e gatos na Turquia ocidental, num total de 362 animais (198 cães e 164 gatos) com lesões de pele (alopecia e descamação) entre 2006 e 2008. Constararam que 52 (14,4%) foram positivos para a presença de fungos através de exame microscópico direto e 70 (19,3%) apresentaram cultura positiva para dermatófitos. Neste trabalho valores maiores foram encontrados no exame microscópico direto (34%) e valores semelhantes (18%) foram encontrados no isolamento fúngico em meio de cultivo.

No trabalho de Silva et al. (2011), com amostras de cães e gatos, obtiveram 11 amostras (26,83%) positivas no exame direto, e no cultivo, apenas seis amostras (14,63%) foram positivas para dermatófitos, sendo 33,30% (2/6) isolados de *M. canis*, 16,67% (1/6) e um isolado *M. gypseum* e 16,67% (1/6) *M. nanum* no microcultivo, o que não concorda com os resultados deste trabalho, uma vez, que foi encontrada uma maior ocorrência de *M. gypseum* (12%), seguido por *M. canis* (2%) e *Trichophyton* sp. (4%).

4.8. Determinação da atividade antifúngica do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado

A concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado, frente às cinco amostras de *Microsporum* spp. foram determinadas numa faixa média de inibição que variou de 0,0326mg/ml-0,1464mg/ml. Para *M. canis* foi de 0,1953mg/ml a 0,09765mg/ml, com média de 0,1464mg/ml; e para *M. gypseum* foi de 0,0488mg/ml a 0,0003813mg/ml, com média de 0,0326mg/ml, tanto para o extrato orgânico, como para o ácido úsnico purificado (Tabela 6).

Tabela 6- Susceptibilidade antifúngica de isolados de *Microsporum* spp. ao extrato orgânico de *Cladonia substellata* Vainio e ao ácido úsnico purificado.

| Extrato orgânico/ Fração | Fungo (n) | Atividade observada (%) | CIM ¹ e CFM ² (mg/ml) | |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------------|---------------------------------------------|--------|
| | | | Faixa | Média |
| <i>C. substellata</i> | <i>M. canis</i> (02) | 100 | 0,1953 - 0,09765 | 0,1464 |
| Ácido úsnico | <i>M. canis</i> (02) | 100 | 0,1953 - 0,09765 | 0,1464 |
| <i>C. substellata</i> | <i>M. gypseum</i> (03) | 100 | 0,0488 – 0,0003813 | 0,0326 |
| Ácido úsnico | <i>M. gypseum</i> (03) | 100 | 0,0488 – 0,0003813 | 0,0326 |

¹concentração inibitória mínima, ²concentração fungicida mínima.

Ribeiro et al. (2006), encontraram atividade antifúngica contra *T. tonsurans*, *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* e *M. canis* de ácido úsnico isolado de *C. substellata* oriunda de Minas Gerais na concentração de 1mg/ml, pelo método de difusão em meio sólido. Lauterwein et al. (1995) demonstraram que metabólitos secundários de diferentes espécies de líquens demonstraram atividade antifúngica. Pires et al. (2012) encontraram potente atividade antifúngica do ácido úsnico *in vitro* contra diferentes espécies de *Candida* spp. (80% de inibição) utilizando a técnica de microdiluição em microplacas.

Embora existam vários trabalhos avaliando a atividade antibacteriana do ácido úsnico (BURKHOLDER et al., 1944; CARRAZZONI, 1975; HUOVINEN; AHTI, 1986; LAUTERWEIN et al., 1995; PEREIRA et al., 1997; HONDA et al., 1998; YANO-MELO et al., 1999; DONLAN, 2001; FALCÃO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2006; MOURA et al., 2008), ainda são poucos os trabalhos com a avaliação da

atividade antifúngica do ácido úsnico e de trabalhos com a determinação da atividade antifúngica. Mugnaini et al. (2012) testaram o óleo essencial da planta *Serpillum thymus* e o óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) que mostrou atividade antifúngica contra *M. canis* isolado de gatos na Itália.

Poucos agentes antifúngicos estão disponíveis e licenciados para utilização na medicina veterinária. A alta resistência de artroconídios de dermatófitos no ambiente e a multiplicidade das espécies hospedeiras dificultam o tratamento e controle dessa enfermidade (CHERMETTE et al., 2008), onde se torna importante a busca por fármacos antifúngicos mais eficazes e com menores efeitos colaterais.

O ácido úsnico, isolado do líquen *C. substellata*, é um derivado do dibenzofurano, e tem apresentado uma vasta gama de atividades biológicas, entre elas: atividade antimicrobiana, antifúngica, antineoplásica, antiviral, anti-pirética, anti-inflamatória, analgésica, anti-protozoários, inseticida, hidratante, anti-histamínica e com atuação na proteção de raios UV (COCHIETTO et al., 2002; INGÓLFSDÓTTIR, 2002; FALCÃO et al., 2004; RIBEIRO et al., 2006; FOURNET et al., 1997).

Mesmo se mostrado hepatotóxico quando utilizado por via sistêmica em humanos, a sua utilização tópica já ocorre para fins medicinais, produtos de perfumaria e aplicações ecológicas, com formulações em creme, pasta de dente, antiséptico bucal, desodorantes e produtos de proteção solar, seja como princípio ativo ou conservante (INGÓLFSDÓTTIR, 2002), dando indícios da sua promissora utilização na área dermatológica animal, seja na utilização do extrato orgânico de *C. substellata*, ou na utilização do ácido úsnico purificado que é encontrado em grande quantidade nessa espécie e tem demonstrado ser o responsável pela maioria das atividades biológicas apresentadas.

5. CONCLUSÃO

Os resultados demonstraram que o extrato orgânico de *C. substellata* e o ácido úsnico purificado apresentaram atividade antimicrobiana e antifúngica em baixas concentrações, inclusive contra *Staphylococcus* spp. resistentes aos antimicrobianos convencionais. Estes atuam inibindo a formação do biofilme em *Staphylococcus* spp., apresentando maior eficácia contra os isolados produtores de biofilme. Estas características são importantes e devem ser consideradas em relação aos medicamentos utilizados rotineiramente na clínica médica, e que têm como entrave, justamente a ação farmacológica frente às bactérias produtoras de biofilme e resistentes aos diversos grupos farmacológicos.

Estes fatos comprovam o grande potencial para utilização do extrato orgânico de *C. substellata* e do ácido úsnico purificado para utilização na área dermatológica veterinária, em especial, no tratamento de otite, piodermatite e dermatofitose em cães e gatos.

6. REFERÊNCIAS

- AARESTRUP, F. M. et al. Effect of abolishment of the use of antimicrobial agents for growth promotion on occurrence of antimicrobial resistance in fecal Enterococci from food animals in Denmark. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, p.2054-2059, 2001.
- ABO-KHATWA, A. N.; AL-ROBAI, A. A.; AL-JAWHARI, D. A. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. **Natural Toxins**, v.4, n.2, p.96-102, 1996
- ABRAHAM, E. P.; CHAIN, E. An enzyme from bacteria able to destroy penicillin. **Nature**, p.146:837,1940.
- AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER-FILHO, L. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, northeast Brazil. **Tropical Bryology**, v.7, p.55-70, 1993.
- AL-BEKAIRI, P. M. et al. Efeitos Mitodepressiva, clastogênica e bioquímicas de (+)-usnic acid in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v.33, n.3, p.217-220, 1991.
- AL-DOORY, Y.; VICE, T. E.; OLIN, D. V. M. A survey of ringworm in dogs and cats. **Journal of the American Veterinary**, v.153, p.429-432, 1968.
- ALMEIDA, C. de F. C. B. R. et al. Comparative study of the antimicrobial activity of native and exotic plants from the Caatinga and Atlantic Forest selected through an ethnobotanical survey. **Pharmaceutical Biology**, v.50, n.2, p.201-7, 2012.
- ANDRADE, C. A. S.; SANTOS-MAGALHÃES, N. S.; MELO, C. P. Thermodynamic characterization of the prevailing molecular interactions in mixed floating monolayers of phospholipids and usnic acid. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 298, p.145, 2006.
- ANDRADE, S. F. **Manual de Terapêutica Veterinária**. 2 ed. São Paulo: Roca, 2002. p.115-145.
- ARANTE, F. C. et al. Micoses, dermatoses e dermatofitose. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.22, n.13, p.13-17, 2003.
- ARCIOLA, C. R.; BALDASSARI, L.; MONTANARO, L. Presence of *icaA* and *icaD* and slime production in a collection of *Staphylococcal* strains from catheter-associated infections. **Journal Clinical of Microbiology**, v.39, p.2151-2156, 2001.
- ASH, L. R.; ORIHEL, T. C. "**Atlas of Human Parasitology**", 3. ed., ASCP Press, Chicago, 1990.
- AUGUST, J. R. Enfermedades del oído, EUA. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.18, p.1-274, 1993.

AUSUBEL, F. M. et al. **Current protocols in molecular biology**. Greene Publishing Associates New York: John Wiley; Sons, 1989.

BANNOEHR, J.; BEM ZAKOUR, N. L.; WALLER, A. S. et al. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin-resistant strains. **Journal of Bacteriology**, 2007, v.189. p.8685-92.

BATISTA, W. B.; PLATT, W. J.; MACCHIAVELLI, R. E. Demography of a shade-tolerant tree in a hurricane-disturbed forest. **Ecology**, v.79, p.38–53, 1998.

BAUER, A. W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.45, p.493-496, 1966.

BEMIS, D. A. et al. Comparison of test to detect oxacillin resistance in *Staphylococcus intermedius*, *Staphylococcus schleiferi*, and *Staphylococcus aureus* isolates from canine hosts. **Journal of Clinical Microbiology**, v.44, p.3374-3376, 2006.

BETANCOURT, O. et al. *Microsporum canis* en gatos dermatologicamente sanos en Temuco, Chile. **Iberoamericana de Micología**, v.26, n.3, p.206-210, 2009.

BIGNARDI, G. E. et al. Detection of the mec-a gene and phenotypic detection of resistance in *Staphylococcus aureus* isolates with borderline or low-level methicillin resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.37, p.53-63, 1996.

BIRCHARD, S. J.; SHERDING, R. G. **Manual Saunders: clínica de pequenos animais**. Roca, São Paulo, 2. ed., 2003, 1783p.

BOND, R. Superficial veterinary mycoses. **Clinics in Dermatology**, v.28, p.226-236, 2010.

BONE, W. J.; JACKSON, W. F. Pathogenic fungi in dermatitis - incidence in two small animal practices in Florida. **Veterinary Medicine/Small Animal Clinician**, v.66, p.140 – 142, 1971.

BORNAND, V. Bacteriology and mycology of otitis externa in dogs. **Schweiz Arch Tierheilkd**, v.134, p.341-348, 1992.

BROWNIE, S. Predictors of dietary and health supplement use in older Australians. **Australian Journal Advanced Nursing**, v.23, p.26-31, 2006.

BURKHOLDER, P. R. et al. Antibiotic activity of lichens. *Proceedings National Academy of Sciences USA*, v.30. p.250-255, 1944.

CABAÑES, F. J. Animal dermatophytosis. Recent advances. **Revista Iberoamericana Micología**, v.17, n.1, p.8-12, 2000.

CAFARCHIA, C. et al. The epidemiology of canine and feline dermatophytoses in southern Italy. **Mycoses**, v.47, n.11-12, p.508-13, 2004.

CAFARCHIA, C. et al. Isolation of *Microsporum canis* from the hair coat pet dogs and cats belonging to owners diagnosed with *M. canis* tinea corporis. **Veterinary Dermatology**, v. 17, p. 327-331, 2006.

CAFISO, V. et al. Presence of the *ica* operon in clinical isolates of *Staphylococcus epidermidis* and its role in biofilm production. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, p.1081-1088, 2004.

CANTER, P. H.; ERNST, E. Herbal supplement use by persons aged over 50 years in Britain. **Drugs Aging**, v.21, p. 597-605, 2004.

CARDARELLI, M. et al. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.53, n.8, p.667-72, 1997.

CARDOSO, M. J. L. et al. Dermatopatias em cães: revisão de 257 casos. **Archives of Veterinary Science**, v.16, n.2, p.66-74, 2011.

CARLOTTI, D. N.; JASMIN P.; GUAGUÉRE E. Utilisation de la marbofloxacine dans le traitement des pyodermites du chien. **Pratique Medicale et Chirurgicale de L'animal de Compagnie**, v.30, p.231-293, 1995.

CARRAZZONI, E. P. **Estudo Químico de Líquens: *Parmelia hababiana* e *Cladonia verticilaris***, 1975.101p. Tese para o Concurso de Livre-Docência em Química de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da UFPE, Recife, 1975.

CARTER, G. R. **Fundamentos da Bacteriologia e Micologia Veterinária**. São Paulo: Roca, 1988, p.11-15, 225-233.

CARVALHO, A. C. B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.314-319, 2008.

CARVALHO, E. A. B. et al. Effects of usnic acid from *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: na ultrastructural study. **Micron**, EUA, v.36, n.1, p.155-161, 2005.

CARVALHO, I. V. da C. et al. **Otite Crônica em Cão: Diagnóstico Laboratorial e Tratamento**. X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX – UFRPE: Recife, 18 a 22 de outubro, 2010.

CASTRO, M. S. de et al. Trends in antimicrobial utilization in a university hospital, 1990-1996. **Revista de Saúde Pública**, v.36, n.5, p.553-8, 2002.

CAVALCANTI, M. D. P. et al. Frequência de dermatófitos e fungos saprófitas em caninos e felinos com sintomatologia sugestiva de dermatopatia micótica atendidos no Hospital Veterinário da UFRPE. **Revista Clínica Veterinária**, v.56, p.24-28, 2003.

CHAH, K. F. et al. Dermatophytes from skin lesions of domestic animals in Nsukka, Enugu State, Nigeria. **Veterinary Dermatology**, v.23, n.6, p.522-E104, 2012.

CHERMETTE, R.; FERREIRO, L.; GUILLOT, J. Dermatofitoses em animais. **Mycopathologia**, v.166, p.385-405, 2008.

CHIFIRIUC, M. C. et al. *In vitro* study of the inhibitory activity of usnic acid on dental plaque biofilm. **Roumanian Archives of Microbiology and Immunology**, v.68, n.4, p.215-22, 2009.

CIZMAN, M. The use and resistance to antibiotics in the community. **International Journal Antimicrobial Agents**, v.21, n.4, p.297-307, 2003.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos. CLSI approved standard M38-A, v.22, n.16. Wayne, PA: **CLSI, 2005**.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests for Bacteria Isolated from Animals; Approved Standard (M31-A3), 3rd ed. CLSI, Wayne, PA: **CLSI, 2008**.

CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Twentieth Informational Supplement. CLSI Document M100-S20. CLSI, Wayne, PA: **CLSI, 2010**.

COCHIETTO, M. et al. A review on usnic acid, an interesting natural compound, Naturwissenschaften. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.89, n.137, 2002.

COELHO, S. de M. de O. et al. Resistance pattern and detection of *mecA* gene in oxacillin-resistant isolates of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus intermedius* from animal and human samples. **Ciencia Rural**, v.37, n.1, p.195-200, 2007.

COHEN, M. L. Epidemiology of Drug Resistance: Implications for a Post-Antimicrobial Era. **Science**, v.257, p. 21, 1992.

COLE, L. K.; KWOCKHA, K. W.; KAWALKI, J. J. et al. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear and middle ear dogs with otitis media, EUA. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.212, p.534-538, 1998.

CONLON, K. M.; HUMPHREYS, H.; O'GARA, J. P. *IcaR* encodes a transcriptional repressor involved in environmental regulation of *ica* operon expression and biofilm formation in *Staphylococcus epidermidis*. **Journal Bacteriology**, v.184, p.4400-4408, 2002.

COSTA, E. O.; DINIZ, L. S. M.; COUTINHO, S. D. et al. Surtos interespecíficos de dermatomicoses por *Microsporium canis* e *Microsporium gypseum*. **Revista de Saúde Pública**, v.28, n.5, p.337-340, 1994.

CUCARELLA, C. et al. Bap, a *Staphylococcus aureus* Surface Protein Involved in Biofilm Formation. **Journal of Bacteriology**, v.183, p.2888-2896, 2001.

CUCARELLA, C. et al. Papel da proteína associada ao biofilme *bap* na patogênese de bovino *Staphylococcus aureus*. **Infection Immunity**, v.72, p.2177-2185, 2004.

CULBERSON, C. F. Improved conditions and new data for the identification of lichen products by a standardized thinlayer-chromatographic method. **Journal of Chromatography**, v.72, p.113-125, 1972.

DE LA MAZA, L. M.; PEZZLO, M. T.; BARON, E. J. **Atlas de diagnostico em microbiologia**. Ed. Artmed, 1999.

DEIGHTON, M. A. et al. Methods for studying biofilms produced by *Staphylococcus epidermidis*. **Methods Enzymology**, v.336, p.177-95, 2001.

DEURENBERG, R. H.; STOBBERINGH, E. E. The evolution of *Staphylococcus aureus*. **Infection Genetics and Evolution**, v.8, n.6, p.747-63, 2008.

DEVRIESE, L. A. et al. *Staphylococcus pseudintermedius* sp. A coagulase-positive species from animals. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 55. p.1569-1573, 2005.

DONLAN, R. M. "Biofilms and device-associated infections". **Emerging Infectious Diseases**, v.7, n.2, p.277-281, 2001.

DROUOT, S. et al. Pets as the main source of two zoonotic species of the *Trichophyton mentagrophytes* complex in Switzerland, *Arthroderma vanbreuseghemii* and *Arthroderma benhamiae*. **Veterinary Dermatology**, v.20, p.13-18, 2009.

DUIJKEREN, E.; WOLFHAGEN, M. J. et al. Human-to-dog transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Emerging Infectious Diseases**, v.10, p.2235–2237, 2004.

EFTEKHAR, F.; SPEERT, D. P. Biofilm formation by persistent and non-persistent isolates of *Staphylococcus epidermidis* from a neonatal intensive care unit. **Journal of Hospital Infection**, v.71, n.2, p.112–116, 2009.

ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária: Doenças de Cão e Gato**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara, v.1, cap.12, 2004, p.47-48.

FALCÃO, E. P. da S. et al. Atividade antimicrobiana de derivados fenólicos do líquen *Ramalina sorediosa* (B. de Lesd) Laundron. **Acta Botanica Brasilica**, v.18, n.4, p.911-918, 2004.

FARIAS, M. F. Terapêutica otológica. In: **Manual de terapêutica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca, 2002, p. 198-204.

FAVRE, T. C. et al. Avaliação das ações de controle da esquistossomose implementadas entre 1977 e 1996 na área endêmica de Pernambuco, Brasil.

Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, v.34, n.6, p.596-576, 2001.

FENNER, W. R. **Consulta Rápida em Clínica Veterinária**. 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. p.344-347, 375.

FITZGERALD, R. H.; RICHARDSON, J. F.; SANE, M. J. Four apparent outbreaks of prosthetic valve endocardites caused by coagulase negative staphylococci. **Zentralblatt Bakteriologie Supplementum**, v.14, p.463-469, 2005.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. Porto Alegre: ARTMED, 2002, 424p.

FOSSUM, T. W. **Cirurgia de Pequenos Animais**. 1. ed. São Paulo: Roca. 2001, 1335p.

FOURNET, A. et al. Activity of Compounds Isolated From Chilean Lichens Against Experimental Cutaneous Leishmaniasis. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.116C, n.1, p.51-54, 1997.

FRANCONI, I. et al. Usnic Acid, a Natural antimicrobial Agent Able To Bacterial Biofilm Formation on Polymer Surfaces. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.48, n.11, p.4360-4365, 2004.

FRANK, L. A. et al. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from dogs with pyoderma. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.222, p.451-4, 2003.

FRASER, W. R. **Consulta Rápida em Clínica Veterinária**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2003. 514p.

FREY, Y. et al. Genetic characterization of antimicrobial resistance in coagulase-negative staphylococci from bovine mastitis milk. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.4, p.2247-2257, 2013.

FUDA, C. C. S.; FISHER, J. F.; MOBASHERY, S. B-Lactam resistance in *Staphylococcus aureus*: the adaptive resistance of a plastic genome. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v.62, p.2617-2633, 2005.

GHIDINI, F. et al. Antibiotic sensitivity of bacterial isolates from cases of canine dermatitis. **New Microbiologica**, v.34, p.403-408, 2011.

GILBERT, P.; MC-BAIN, A. J.; RICKARD, A. H. Formation of microbial biofilm in hygienic situations: a problem of control. **International Biodeterioration & Biodegradation**, v.51, n.4, p. 45-248, 2003.

GRISOLD, A. J. et al. Detection of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and simultaneous confirmation by automated nucleic acid extraction and Real-Time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.40, n.7, p.2392-2397, 2002.

GRUMEZESCU, A. M. et al. Inhibitory activity of Fe(3) O(4)/oleic acid/usnic acid-core/shell/extra-shell nanofluid on *S. aureus* biofilm development. **IEEE Trans Nanobioscience**, v.10, n.4, p.269-74, 2011.

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

GUEDES, R. M. C.; NOGUEIRA, R. H. G.; TUDURY, E. A. Diagnóstico citológico de lesões proliferativas e inflamatórias através da técnica de punção de tecidos com agulha fina. **A Hora Veterinária**, v.16, n.96, p.15-21, 1997.

GUPTA, V. K. et al. Membrane-damaging potential of natural L(-)-usnic acid in *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.31, n.12, p.3375-3383, 2012.

HANSELMAN, B. A.; KRUTH, S. A.; ROUSSEAU, J. et al. Coagulase positive staphylococcal colonization of humans and their household pets. **Canadian Journal of Veterinary**, 2009. v. 50. p. 954-958.

HAUSCHILD, T.; WÓJCIK, A. Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis. **Research Veterinary Science**, v.82, p.1-6, 2007.

HIRAMATSU, K. Molecular evolution of MRSA. **Microbiology and Immunology**, v.39, p.531-543, 1995.

HIRAMATSU, K. et al. The emergence and evolution of methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Trends in Microbiology**, v.9, p.486-493, 2001.

HILL, P. B. et al. Survey of the prevalence, diagnosis and treatment of dermatological conditions in small animals in general practice. **Veterinary Record**, v.158, p.533-539, 2006.

HILLIER, A.; GRIFFIN, C. E. ACVD task force on canine atopic dermatitis (I): incidence and prevalence. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, n.81, p.147-151, 2001.

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

HONDA, N. K. et al. Antimycobacterial activity of lichen substances. **Phytomedicine**, v.17, n.5, p.328-332, 2010.

HONDA, N. K.; VILEGAS, W. A química dos líquens. **Química Nova**, v.21, p.6, 1998.

HORVATH, C. Management of canine pyoderma. **Companion Animal**, v.12, n.1, p. 1-7, 2007.

HOSKINS, J. D. **Pediatria Veterinária – cães e gatos do nascimento aos 6 meses** – 2 ed. Rio de Janeiro: Interlivros, 1997. p.229-232.

HUERTA, B. et al. Risk factors associated with the antimicrobial resistance of staphylococci in canine pyoderma. **Veterinary Microbiology**, v.150. p.302-308, 2011.

HUOVINEN, K.; AHTI, T. The composition and contents of aromatic lichen substances in the genus *Cladonia* section *Unciales*. **Annales Botanici Fennici**, v.23, p.173-188, 1986.

INGÓLFSDÓTTIR, K. Usnic acid. **Phytochemistry**, v.61, p.729-736, 2002.

JAGER, S. et al. Disintegration of *Staphylococcus epidermidis* biofilms under glucose-limiting conditions depends on the activity of the alternative sigma factor sigma B. **Applied and Environmental Microbiology**, v.71, p.5577-5581, 2005.

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

JUNGERMAN, P. F.; SCHWARTZMAN, R. M. **Veterinary medical mycology**. Philadelphia: W.B. Saunders, 1972. 200p.

JUNIOR, P. S. et al. Dermatofitose (fungos dermatófitos). **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. São Paulo, v. 38, n. 5, p. 46-48, 2000.

KAHN, C. M.; LINE S. **Merck Veterinary Manual**, 10. ed., 2010, 3000p.

KATAYAMA, T. et al. Immunoneutralization of Glycoprotein Iba Attenuates Endotoxin-Induced Interactions of Platelets and Leukocytes With Rat Venular Endothelium In Vivo. **Circulation Research**, v.86, n.10, p.1031-1037, 2000.

KATEETE, D. P. et al. Identification of *Staphylococcus aureus*: DNase and Mannitol salt agar improve the efficiency of the tube coagulase test. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, p.9-23, 2010.

KAWAKAMI, T. et al. Antimicrobial susceptibility and methicillin resistance in *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus schleiferi* subsp. coagulans isolated from dogs with pyoderma in Japan. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.72, n.12, p.1615-9, 2010.

KIKUCHI, M.; OHSHIMA, K. Cervical Lymphadenopathy, Fever and Leukopenia (Histiocytic-Necrotizing Lymphadenitis or Kikuchi Disease). **Pathology Case Reviews**, v.9, n.5, p.199–205, 2004.

KIM, S. et al. Mechanical effects, antimicrobial efficacy and cytotoxicity of usnic acid as a biofilm prophylaxis in PMMA. **Journal of Materials Science-Materials in Medicine**, v.22, n.12, p.2773-2780, 2011.

KIMBERLY, K. J. What drives bacteria to produce a biofilm? **FEMS Microbiology Letters**, v.236, p.163-173, 2004.

KONEMAN, E. W. et al. Antimicrobial Resistance. **Color Atlas and Text book of Diagnostic Microbiology**. Fifth Edition, USA, Philadelphia, Lippincott Raven Publishers, v.15, p.798-800, 1997.

KRUMPERMAN, P. H. Multiple antibiotic resistance indexing of *Escherichia coli* to identify high-risk sources of fecal contamination of foods. **Applied and Environmental Microbiology**, v.46, n.1, p.165-170, 1983.

KUMAR, K. C. S.; MULLER, K. Medicinal plants from Nepal: II. Evaluation as inhibitors of lipid peroxidation in biological membranes. **Journal of Ethnopharmacology**, v.64, p.135-139, 1999.

LACAZ, C. S.; NEGRO, G. Drogas antifúngicas. Terapêutica das micoses. In: LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C. **Micologia médica: fungos, actinomicetos e algas de interesse médico**. São Paulo:Savier, 1991, cap.38. p.616-651.

LAUTERWEIN, M. et al. *In vitro* activities of lichen secondary metabolites vulpinic acid (+)-úsnic acid, and (-)-úsnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, p.2541-2543, 1995.

LAWEWNCE, J. R. et al. Optical sectioning of microbial biofilms. **Journal of Bacteriology**, v.173, p.6558-6567, 1991.

LEITE, C. A. L. **As otites de cães e gatos**. Parte 1 – Epidemiologia. *Cães Gatos*, v.15, p.22-26, 2000.

LI, X. Z., et al. β -lactam resistance and beta-lactamases in bacteria of animal origin. **Veterinary Microbiology**, v.121, p.197-214, 2007.

LILENBAUM, W.; NUNES, E. C.; AZEREDO, M. Prevalence and antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* isolated from the skin of clinically normal cats, EUA. **Letters in Applied Microbiology**, v. 27, p.224-228, 1998.

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

LIVORSI, D. J. et al. Prevalence of *blaZ* gene types and the inoculum effect with cefazolin among bloodstream isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v.56, n.8, p.4474-7, 2012.

LOEFFLER, A. L. et al. Original article Risk factors for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) infection in dogs and cats: a case-control study. **Veterinary Research**, 2007.

LOPES, A. C. **Tratado de clínica médica**. São Paulo: Editora Roca, 2009. 2659-2684.

LÓPEZ, J. R. et al. **Uso de fármacos en dermatología de pequeños animales** Consulta de Difusión Veterinária v. 10 p.87-97, 2002.

MACHADO, M. L. da S.; APPELT, C. E.; FERREIRO, L. Dermatofitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. **Acta Scientiae Veterinaria**, v.32, n.3, p.225-232, 2004.

MACIEL, A. S.; VIANA, J. A. Dermatofitose em cães e gatos: uma revisão - primeira parte. **Revista Clínica Veterinária**, v.56, p.48-56, 2005.

MANOJLOVIĆ, N. et al. Chemical composition of three *Parmelia* lichens and antioxidant, antimicrobial and cytotoxic activities of some their major metabolites. **Phytomedicine**, v.19, n.13, p.1166-1172, 2012.

MARTINEAU, F. et al. Development of a PCR Assay for Identification of Staphylococci at Genus and Species Levels. **Journal of Clinical Microbiology**, v.39, p.2541-2547, 2001.

MCKENNY, D. et al. O *ica* locus de *Staphylococcus epidermidis* codifica a produção do polissacarídeo capsular/adesina. **Infection and Immunity**, v.66, p.711-720, 1998.

MENDOZA, M. H. et al. A zoonotic ringworm outbreak caused by a dysgonic strain of *Microsporium canis* from stray cats. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.27, n.2, p.62-65, 2009.

MENESES, A. M. C. et al. Ocorrência das dermatopatias em cães e gatos. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v.2, p.20, 2000.

MENG, J. et al. Antibiotic resistance of *Escherichia coli* O157:H7 and O157:NM isolated from animals, food and humans. **Journal of Food Protection**, v.61, n.11, p.1511-1514, 1998.

MERINO, N. et al. Protein A-Mediated Multicellular Behavior in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.191, n.3, p.832-843, 2009.

MERINO, S. et al. Colonization Factor (Production of Lateral Flagella) of Mesophilic *Aeromonas* spp. Is Inactive in *Aeromonas salmonicida* Strains. **Applied and environmental microbiology**, p. 663-667, 2003.

MIGUEL, M. D.; MIGUEL, G. O. **Desenvolvimento de fitoterápicos**. São Paulo: Robe, 1999.

MONOD, M. Proteases from Dermatophytes. **Mycopathologia**, v.166, p.285-294, 2008.

MORAILLON, R. et al. **Manual Prático de Terapêutica dos Caninos e Felinos**. Andrei, 2004. p.1007-1011.

MORIELLO, K. A., DeBOER, D. J. Feline dermatophytosis: recent advances and recommendations for therapy. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v.25, n. 4, p. 901-921, 1995.

MORIELLO, K. A. Treatment of dermatophytosis in dogs and cats: review of published studies. **Veterinary Dermatology**. 15: 99-107, 2004.

MOURA, M. P. S.; LIRA, M. C. B.; MAGALHÃES, N. S. S. M. Validation of a UV-spectrophotometric analytical method for the determination of usnic acid in liposomes. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.44, n.4, 2008.

MUGNAINI, L. et al. *In vitro* and *in vivo* antifungal activity of some essential oils against feline isolates of *Microsporum canis*. **Journal de Mycologie Médicatrice**, v.22, n.2, p.179-84, 2012.

MULLER, E. E.; FREITAS, J.; ALFIERI, A. A. Isolamento, caracterização e susceptibilidade a antimicrobianos de estafilococos coagulase-positivos (*S. aureus* e *intermedius*) de cães com lesões de pele, na região de Londrina. **Seminário. Ciências Agrárias**, Londrina/PR, Editora da Universidade Estadual de Londrina, v.07, n. ESPECIAL, p.34-37, 1986.

MULLER, G. H.; KIRK, R. W.; SCOTT, D. W. et al. **Dermatologia de pequenos animais**. 5ª edição. Rio de Janeiro: Interlivros, 1996, 1130p.

MÜLLER, K. Pharmaceutically relevant metabolites from lichens. **Applied Microbiology Biotechnology**, n.56, p.9-16, 2001.

NASH, T. H. Lichen Biology - Introduction; In **Lichen Biology**; NASH III, T. H.; Ed.; Cambridge University Press, Cambridge, 1996; p.1.

NELSON R. W.; COUTO C. G. Distúrbios dos nervos periféricos e da junção neuromuscular. In: _____. **Medicina interna de pequenos animais**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001, cap.73, p. 819-828.

NIEMEYER, D. M.; PUCCIM, J.; THANASSI, J. A. Role of *mecA* transcriptional regulation in the phenotypic expression of methicillin resistance in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Bacteriology**, v.178, p.5464-5471, 1996.

NOBRE, M. de O. et al. Antifungal drugs for small and large animals. **Ciência Rural**, v.32, n.1, 2002.

NÓBREGA, N. A. et al. Produção de compostos fenólicos a partir de células imobilizadas do líquen *Parmotrema andinum* (Müll. Arg.) Hale e avaliação de atividade antimicrobiana. **Acta Botanica Brasílica**, v. 26, p.101-107, 2012.

NOËL, F.; PIÉRARD-FRANCHIMONT, C.; PIÉRARD, G. E. et al. Fungi, pets and their owners. **Revue Medical de Liege**, v.66, n.11, p.589-95, 2011.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v.56, p.519–523, 2007.

O'GARA, J. P. *Ica* and Beyond: Biofilm Mechanisms and Regulation in *Staphylococcus epidermidis* and *Staphylococcus aureus*. **FEMS Microbiology Letters**, v.270, p.179-188, 2007.

OLIVEIRA, A. K. et al. Pirambeba *Serrasalmus brandtii* LÜTKEN, 1875 (Osteichthyes, Serrasalminae) in the Cajuru Reservoir, São Francisco River Basin, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.64, n.1, p.117-124, 2004.

OLIVEIRA, D. Methicillin-Resistance in *Staphylococcus aureus* is not affected by the overexpression in trans of the *mecA* gene repressor: A Surprising Observation. **PLoS ONE** [1932-6203] v.6, n.8, 2011.

OLIVEIRA, G. de et al. Conserving the Brazilian semiarid (Caatinga) biome under climate change. **Biodiversity and Conservation**, v.21, n.11, p.2913-2926, 2012.

OLIVEIRA, G. A.; LEVY, C. E.; MAMIZUKA, E. M. Study of the resistance profile of 626 strains of *Staphylococcus aureus* isolated in 25 Brazilian hospitals from september/95 do June/97. **Jornal Brasileiro de Patologia**, v.36, n.3, p.147-56, 2000.

OLIVEIRA, L. C. et al. Profile of microorganisms isolated from dogs with associated media and extern otitis. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.58, n.6, p.1009-1017, 2006.

OLIVEIRA, L. C. et al. Antimicrobial sensitivity of bacteria from otitis externa in dogs. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, n.3, 2005.

PATEL, A.; FORSYTHE, P. **Dermatologia em Pequenos Animais**. Rio de Janeiro:Elsevier, 2010. 279p.

PEREIRA, E. C. et al. Antimicrobial activity of biological active compounds from the lichen *Caldonia crispatula*. **Boletín Ecotópica: Ecosistemas tropicales**, n.31, p.9-19, 1997.

PEREIRA, E. C. Produção de metabólitos por espécies de *Cladoniaceae* (líquen), a partir de imobilização celular. **PhD Thesis**, 1998, 238p.

PERILLO, J. et al. Molecular characterization of enterotoxigenic and borderline oxacillin resistant *Staphylococcus* strains from ovine milk. **Food Microbiology**, v.32, n.2, p.265-273, 2012.

PINARD, M.; CHERMETTE, R.; BUSSIÉRAS, S. Diagnostic et prophylaxie des teignes des carnivores domestiques - Étude critique à partir d'une enquête à l'École National Vétérinaire d'Alfort. **Recueil de Médecine Vétérinaire**, v.163, p.1107-1116, 1987.

PINHEIRO, A. Q.; MOREIRA, J. L.; SIDRIM, J. J. C. Dermatofitoses no meio urbano e a coexistência do homem com cães e gatos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, p.287-294, 1997.

PIRES, R. H. ; LUCARINI, R.; MENDES-GIANNINI, M. J. Effect of usnic acid on *Candida orthopsilosis* and *C. parapsilosis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.56, n.1, p.595-7, 2012.

POMPILIO, A. et al. Antimicrobial and antibiofilm activity of secondary metabolites of lichens against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strains from cystic fibrosis patients. **Future Microbiology**, v.8, n.2, p.281-92, 2013.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**, tradução WEISS, L.H.N. e WEISS, R.D.N. Porto Alegre: Artmed, 2005, 511p.

R CORE TEAM. **R: A language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, 2012. ISBN 3-900051-07-0, URL: <http://www.R-project.org/>.

RANKOVIC, B. et al. Biological Activities of *Toninia candida* and *Usnea barbata* Together with Their Norstictic Acid and Usnic Acid Constituents. **International Journal of Molecular Sciences**, v.13, n.11, p.14707-14722, 2012.

RAO, J. G. et al. Cluster of clinical isolates of epidemic methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (EMRSA) with a negative deoxyribonuclease (DNase) test-implications for laboratory diagnosis and infection control. **Journal of Hospital Infection**, v.51, n3, p. 238-239, 2002.

RIBEIRO, A. Q.; LEITE, J. P. V.; DANTAS-BARROS, A. M. Perfil de utilização de fitoterápicos em farmácias comunitárias de Belo Horizonte sob a influência da legislação nacional. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1, p.65-70, 2005.

RIBEIRO, S. M. et al. Produção de metabólitos bioativos pelo líquen *Cladonia substellata* Vainio, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v.20, n.2, p.265-272, 2006.

REIS, J. C. **Estatística Aplicada à Pesquisa em Ciência Veterinária**. Olinda: Luci Artes Gráficas Ltda. 2003, 615p.

RIDDELL, R. W. Permanent stained mycological preparations obtained by slide culture. **Mycologia**, v.42, p.265-270, 1950.

ROACH, J. A. G. et al. Determination of usnic acid in lichen toxic to elk by liquid chromatography with ultraviolet and tandem mass spectrometry detection **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 7, v.54, p.2484- 2490, 2006.

ROCHLEDER, F. et al. Identification of Lichen Substances, **Springer-Verlag**, v.1843, n.48, p.1, 1996.

ROSSER, J. R. Pústulas e Pápulas. In ETTINGER, S. J.; FELDMAN, E. C. **Tratado de medicina interna veterinária: doenças do cão e do gato**. 5. ed. cap. 12, Rio de Janeiro: Guanabara, 2004, p.44-48.

RUSCHER, C. et al. Prevalence of Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. **Veterinary Microbiology**, v.136, p.197- 201, 2009.

SABET, N. S. et al. Detection of *mecA* and *ermA* genes and simultaneous identification of *Staphylococcus aureus* using triplex real-time PCR from Malaysian *S. aureus* strain collections. **International Journal os Antimicrobial Agents**, v.29, p.582-585, 2006.

SAMPAIO, I. B. M. **Estatística aplicada à experimentação animal**. 3ª edição. Editora FepMVZ, 2007, 265p.

SANT'ANA, A. de S.; AZEREDO, D. R. P. Comparison of petrifilm rsa system with the traditional methodology for the enumeration of coagulase-positive in foods. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.3, p.531-535, 2005.

SANTOS, R. R. Sensitivity *in vitro* of the microbiota of the ear of dogs with otitis externa to five antimicrobials. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.35, p.s433-s435, 2007.

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

SAWANT, A. A.; GILLESPIE, B. E.; OLIVER, S. P. Antimicrobial susceptibility of coagulase-negative *Staphylococcus* species isolated from bovine milk. **Veterinary Microbiology**, 2009.

SCHLOTTER, K. et al. Phenotyping and microarray based genotyping of the antibiotic resistance of MRSA and MSSA from quarter milk samples of clinically healthy dairy cows. **Berl Munch Tierarztl Wochenschr**, v.126, n.1-2, p.37-45, 2013.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. Muller and Kirk. **Dermatologia de pequenos animais**. 5.ed. Rio de janeiro: Interlivros, 1996, 1130p.

SCOTT, D. W.; MILLER, W. H.; GRIFFIN, C. E. **Small Animal Dermatology**. 6 ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2001, 1528p.

SEGATORE, B. et al. *In vitro* interaction of usnic acid in combination with antimicrobial agents against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* clinical isolates determined by FICI and ΔE model methods. **Phytomedicine**, v.19, n.3-4, p.341-7, 2012.

SEKER, E.; DOGAN, N. Isolation of dermatophytes from dogs and cats with suspected dermatophytosis in Western Turkey. **Preventive Veterinary Medicine**, v.1, n. 98, p.46-51, 2011.

SHOME, B. R. et al. Multiplex PCR assay for species identification of bovine mastitis pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v.111, p.1349-1356, 2011.

SILVA, L. L. H. et al. Dermatofitose na saúde pública. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.35, n.9, p.102-103, 1998.

SILVA, M. I. G. et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, p.455-462, 2006.

SILVA, V. F. et al. Agentes fúngicos da dermatofitose em cães e gatos do município de Xanxerê, Santa Catarina. **Seminário: Ciências Agrárias**, v.32, n.3, p.1095-1100, 2011.

SOUZA, A. E. F. et al. Dermatofitose associadas a fungos do gênero *Microsporum*. **Clínica Veterinária**, v.13, n.5, p.24-26, 2002.

SOUZA, T. M. et al. Estudo retrospectivo de 761 tumores cutâneos em cães. **Ciência Rural**, v.36, n.2, p.555-560, 2006.

STEGMANN, R. et al. Human infection associated with methicilin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* ST71. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n.65, p.2047-2048, 2010.

STEPANOVIC, S. et al. Quantification of biofilm in microtiter plates: overview of testing conditions and practical recommendations for assessment of biofilm production by staphylococci. **APMIS**, v.115, n.8, p.891-9, 2007.

TANNER, M. A.; EVERETT, C. L.; YOVAN, D. C. Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. **Journal of Clinical Microbiology**, v.38, n.4, p.1628– 1631, 2000.

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

TILLEY, L. P.; SMITH, F. W. JR. **Consulta veterinária em 5 minutos**. Editora Manole, São Paulo, 2ª edição, 2003, 1215p.

TINDLE, H. A et al. Trends in use of complementary and alternative medicine by US adults: 1997-2002. **Alternative Therapies Health and Medicine**, v.11, p.42-49, 2005.

TUROLLA, M. S. dos R.; NASCIMENTO, E. de S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.42, n.2, 2006.

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

VANDŽUROVÁ, A. et al. *Staphylococcus nepalensis* in the guano of bats (Mammalia). **Veterinary Microbiology**, v.100, p. 1-2, DOI: 10.1016, 2013.

VARALDO, P. E. The 'borderline methicillin-susceptible' *Staphylococcus aureus*. **Journal Antimicrobial Chemotherapy**, v.31, p.1–4,1993.

VASUDEVAN, P. et al. Phenotypic and genotypic characterization of bovine mastitis isolates of *Staphylococcus aureus* for biofilm formation. **Veterinary Microbiology**, v.92, p.179–185, 2003.

VEIGA-JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Estado do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, p.308-313, 2008.

VENKATARAMANA, D. ; KRISHNA, K. High-performance liquid chromatographic determination of usnic acid in plasma. **Journal of Chromatography**, v.575, p.167-170, 1992.

VERMOUT, S. A. et al. Secreted dipeptidyl peptidases as potential virulence factors for *Microsporium canis*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v.54 p.299-308, 2008.

VICENTE, C. **Fisiologia de las substancias liquenicas**. Madrid: Allandra, 162p. 1975.

VICENTE, C.; CIFUENTES, B. L-usnate and permeability. **Cryptogamie Bryologie Lichenologie**, v.2, n.2, p.213-222, 1981.

VITALE, C. Methicilin-resistant canine pyoderma. In: BONAGUARA, J. D.; TWEDT, D. C. (Eds.). **Kirk's current veterinary therapy**.14.ed.[S.I]: Saunders Elsevier, 2009, p. 449-450.

VUONG, C. et al. Impact of the *agr* quorum-sensing system on adherence to polystyrene in *Staphylococcus aureus*. **Journal Infection Disease**, v.182, p.1688–1693, 2000.

WADE, K. A. et al. Comparison of six methods of extracting *Mycobacterium tuberculosis* DNA from processed Sputum for testing by quantitative Real-time PCR. **Journal of Clinical Microbiology**, v.43, n.5, p.2461-2473, 2005.

WEESE, J. S.; DUIJKEREN, E. VAN. Methicilin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Veterinary Microbiology**, v.140, n.3-4, p.418-29, 2010.

WILLEMSE, T. **Dermatologia clínica de cães e gatos**. 2. ed. São Paulo: Manole Ltda, 1998. 50p.

WOOLLEY, K. L.; KELLY, R. F.; FAZAKERLEY, J. et al. Reduced *in vitro* adherence of *Staphylococcus* species to feline corneocytes compared to canine and human corneocytes. **Veterinary dermatology**, v.19, n.1, p.1-6, 2008.

YANO-MELO, A. M.; VICENTE, C.; XAVIER-FILHO, L. Influence of *Cladonia substellata* Vainio extracts and usnic acid on germination and growth of *Allium cepa* L. seedlings. **Tropical Bryology**, v.16, p.11-15, 1999.

YEON-SOO, S. E. O. et al. Biofilm-forming associated genotypic and phenotypic characteristics of *Staphylococcus* spp. isolated from animals and air. **Research in Veterinary Science**, v.85, n.3, p.433-438, 2008.

YOSHIDA, N.; NAITO, F.; FUKATA, T. Studies of certain factors affecting the microenvironment and microflora of the external ear of the dog in health and disease. **Journal Veterinary Medicine Science**, v.64, p.1145-1147, 2002.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V. Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento da indústria de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v. 24, n. 1, p.147-152, 2001.

ZAROR, L. C.; MORENO, M. I. White piedra. Report of one case. **Revista Médica de Chile**, v.124, p.593-596, 1996.

ZHAO, Q. et al. Reduction of bacterial adhesion on ion-implanted stainless steel surfaces. **Medical Engineering & Physics**, v.30, n.3, p.341-9, 2008.

ZIEBUHR, W. et al. Nosocomial infections by *Staphylococcus epidermidis*: how a commensal bacterium turns into a pathogen". **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.28 Suppl 1, p.S14-20, 2006.

7. ANEXOS