

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Veterinária
Programa de Pós-Graduação em Veterinária



Dissertação

Microorganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: Resistência a antimicrobianos e bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae

Karina Affeldt Guterres

Pelotas, 2015

Karina Affeldt Guterres

Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: Resistência a antimicrobianos e bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlete Brum Cleff

Co-orientadora: Dr^a. Silvia Regina Leal Ladeira

Pelotas, 2015

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G111m Guterres, Karina Affeldt

Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: resistência a antimicrobianos e bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae / Karina Affeldt Guterres ; Marlete Brum Cleff, orientadora ; Silvia Regina Leal Ladeira, coorientadora. — Pelotas, 2015.

96 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2015.

1. Bauhinia forficata. 2. Família lamiaceae. 3. Resistência bacteriana. 4. Sporothrix brasiliensis. I. Cleff, Marlete Brum, orient. II. Ladeira, Silvia Regina Leal, coorient. III. Título.

CDD: 636.0895532

Karina Affeldt Guterres

Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: Resistência a antimicrobianos e bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 27 de fevereiro de 2015.

Banca examinadora:

Prof^a. Dr^a. Marlete Brum Cleff (Orientador)
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Melissa Orzechowski Xavier
Doutora em Ciências Pneumológicas pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a Dr^a. Renata Osório de Faria
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a Dr^a. Ana Raquel Mano Meinerz
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Agradeço primeiramente à minha mãe Ledi, que sempre lutou e se dedicou para que eu recebesse toda a educação e estrutura necessárias para a construção do meu caráter e de minha dignidade. Devo a ela as minhas conquistas, pois sempre me apoiou em todos os momentos, fazendo o que fosse possível para me ajudar.

Aos amigos, colegas e professores do Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) e de Micologia da Faculdade de Veterinária UFPel (MicVet-UFPel), em especial a Médica Veterinária Silvia Ladeira, minha co-orientadora, pelos ensinamentos, paciência, apoio no desenvolvimento deste trabalho e momentos de descontração. À todas as pessoas que, direta ou indiretamente, contribuíram com este trabalho, bolsistas, estagiárias e funcionários.

Ao Fitopeet (Grupo de pesquisa, ensino e extensão em produtos naturais na clínica médica veterinária) pela amizade, apoio, ensinamentos e boas risadas.

Agradeço também a minha orientadora Marlete Brum Cleff, por sua compreensão, confiança, incentivo e principalmente por sua amizade. Agradeço por todo o apoio e boa vontade de me ajudar numa etapa tão importante da minha vida como esta.

Às minhas amigas irmãs, Claudinha, Carol e Cris pelo companheirismo, amizade, ajuda nos momentos difíceis, conversas, trabalhos e principalmente pelos momentos de diversão e risadas que passamos juntas.

A professora Raquel Lüdtke pelas identificações botânicas das espécies vegetais.

Ao professor Rogério Freitag, a Victoria Gonçalves e a Daiane Blank pela disponibilização do Laboratório de Química e ajuda nesta pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos, e aos demais órgãos financiadores CNPq e FAPERGS.

Ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária, a todos professores, alunos e servidores da Faculdade de Veterinária.

Agradeço também a todos os animais que passaram e passarão pela minha vida, pois são motivo de alegria, gratidão e orgulho da minha profissão.

Muito obrigada!

***A compaixão pelos animais
está intimamente ligada à bondade de caráter,
e quem é cruel com os animais
não pode ser um bom homem.
(Arthur Schopenhauer)***

Resumo

GUTERRES, Karina Affeldt. **Microrganismos de lesões cutâneas de pequenos animais: Resistência a antimicrobianos e bioprospecção de extratos de plantas da família Lamiaceae e Fabaceae**. 2015. 96f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

As afecções dermatológicas apresentam grande destaque em pequenos animais, podendo ser causadas por bactérias, principalmente *Staphylococcus* e *Streptococcus*, ou fungos, destacando o complexo *Sporothrix*. A resistência bacteriana e fúngica aos antimicrobianos é fonte de preocupação, aumentando as pesquisas em busca de novas opções terapêuticas. Assim, o objetivo do trabalho foi isolar e identificar bactérias provenientes de lesões cutâneas de cães, determinando o perfil de resistência destas; avaliar a atividade *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* frente às bactérias e a *Sporothrix brasiliensis* e determinar a sensibilidade dos isolados bacterianos aos óleos essenciais de *Origanum vulgare* (orégano), *Origanum majorana* (manjerona) e *Rosmarinus officinalis* (alecrim). Os óleos essenciais foram obtidos através de arraste de vapor em Clevenger, sendo testados nas concentrações de 250 a 0, 4882 µg/mL e o extrato hidroalcoólico através de rotaevaporador, sendo testado nas concentrações de 100 a 0, 195 mg/mL. Para isolamento e identificação bacteriana, foram coletadas secreções de lesões cutâneas ulceradas de 40 cães e semeadas em placas contendo Ágar MacConkey e Ágar Sangue colocadas em estufa, a 37°C, durante 24 horas, sendo após o crescimento bacteriano, realizadas provas bioquímicas, confirmadas por método automatizado, para identificação de gênero e espécie. O teste de susceptibilidade frente aos antibióticos foi realizado de acordo com Kirby-Bauer e frente aos extratos vegetais através de microdiluição em caldo, sendo esta última técnica aplicada também para avaliação *in vitro* de *B. forficata* frente a 7 isolados de *S. brasiliensis*, cultivados em meio Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol a 25°, 7 dias. Como resultados, foram isoladas 46 bactérias, destacando-se *Staphylococcus* (n=19), *Pseudomonas* (n=8), *Proteus* (n=4) e *Escherichia coli* (n=3). Nos testes de sensibilidade aos antibióticos as bactérias foram em geral mais resistentes aos β-lactâmicos e mais sensíveis à enrofloxacin. *B. forficata* não apresentou atividade frente à maioria das bactérias nas concentrações testadas. Em relação aos óleos analisados, houve diferença estatística (p<0,05) para CIM e CBM entre os isolados de bactérias Gram positivas. O óleo essencial de alecrim obteve menor CIM e CBM (0,4 µg/mL), seguido de orégano (1,9 µg/mL de CIM e 3,9 µg/mL de CBM) e manjerona (0,4 µg/mL de CIM e CBM), sendo que os dois últimos não diferiram estatisticamente. Com o grupo de bactérias Gram negativas, os óleos de manjerona (CIM de 0,4 µg/mL e CBM de 1,9 µg/mL) e alecrim (0,9 µg/mL de CIM e CBM) obtiveram menor CIM e CBM, não diferindo estatisticamente. O óleo essencial de orégano (CIM e CBM de 0,4 µg/mL), não diferiu estatisticamente do óleo essencial

de alecrim. *B. forficata* frente ao *S. brasiliensis*, apresentou CIM de 100 mg/mL e CFM >100 mg/mL. Mais estudos acerca da atividade destas plantas devem ser realizados, sendo outras formas de extratos de *B. forficata*, concentrações e outras partes vegetais testadas, visto que esta apresenta atividade frente a outros fungos, podendo vir a ser uma alternativa no tratamento da esporotricose. Tratando-se dos óleos da família Lamiaceae, com os resultados obtidos, estes podem ser uma nova alternativa terapêutica, em casos de resistência bacteriana, necessitando de maiores estudos pré-clínicos.

Palavras-chave: *Bauhinia forficata*; Família Lamiaceae; resistência bacteriana; *Sporothrix brasiliensis*

Abstract

GUTERRES, Karina Affeldt. **Microorganisms of cutaneous lesions of small animals: Antimicrobial resistance and bioprospecting Lamiaceae family plant extracts and Fabaceae.** 2015. 96f. Dissertation (Master degree in Sciences) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2015.

The dermatologic diseases present major highlight in small animals and can be caused by bacteria, especially Staphylococcus and Streptococcus, or fungus, highlighting the *Sporothrix* complex. Bacterial and fungal resistance to antimicrobial agents is a source of concern, increasing research for new therapeutic options. The objective of this study was to isolate and identify bacteria from skin lesions of dogs, determining the resistance profile of these; evaluate the *in vitro* activity of hydroalcoholic extract of *Bauhinia forficata* on the bacteria and *Sporothrix brasiliensis* and determine the sensitivity of bacterial isolates to essential oils of *Origanum vulgare* (oregano), *Origanum majorana* (marjoram) and *Rosmarinus officinalis* (rosemary). The essential oils were obtained by entrainment in vapor Clevenger being tested at concentrations of 250 to 0 4,882 mg/mL and the hydroalcoholic extract through rotaevaporator being tested in concentrations of 100 to 0 195 mg/mL. For bacterial isolation and identification secretions were collected skin ulcers dogs 40 and seeded in plates containing MacConkey blood agar and placed in an oven at 37 ° C for 24 hours after the bacterial growth being carried out biochemical tests confirmed by automated method for gender identification and species. The front of antibiotic susceptibility testing was performed in accordance with Kirby-Bauer and facing the plant extracts by broth microdilution, the latter technique applied also to *in vitro* evaluation against *B. forficata* 7 isolates of *S. brasiliensis* grown in Sabouraud Dextrose medium with chloramphenicol at 25 °C, 7 days. As a result, bacteria were isolated 46, standing out Staphylococcus (n = 19), Pseudomonas (n = 8), Proteus (n = 4) and *Escherichia coli* (n = 3), and in front of sensitivity tests antibiotics, bacteria in general more resistant to β -lactam and more sensitive to enrofloxacin. *B. forficata* showed no activity against most bacteria studied at different concentrations. Regarding the oil analyzed, showed a statistical difference ($p < 0.05$) for MIC and MBC between the strains of Gram positive bacteria. The rosemary essential oil had lower MIC and MBC (0,4 mg/mL), followed by oregano (1,9 mg/mL of MIC and 3,9 mg/mL of CBM) and marjoram (0,4 mg/mL MIC and MBC), with the latter two did not differ statistically. With the group of Gram negative bacteria, marjoram oils (MIC 0,4 mg/mL and CBM of 1,9 mg/mL) and rosemary (0,9 mg/mL of MIC and MBC) had lower MIC and MBC did not differ statistically. The essential oil of oregano (MIC and MBC of 0,4 mg/mL) did not differ statistically from the essential oil of rosemary. *B. forficata* against *S. brasiliensis* showed an MIC of 100 mg/mL and CFM than 100 mg/mL. More studies on the activity of these plants should be performed, and other forms of *B. forficata* extracts, concentrations and other plant parts tested, as it has

activity against other fungi and could be an alternative in the treatment of sporotrichosis. In the case of the family Lamiaceae oils, with the results obtained, they may be a new therapeutic option in cases of bacterial resistance, necessitating higher preclinical studies.

Key-words: *Bauhinia forficata*; Lamiaceae Family; bacterial resistance; *Sporothrix brasiliensis*

Lista de Figuras

ARTIGO 1 Avaliação *in vitro* de óleos essenciais da família Lamiaceae e extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* em bactérias isoladas de lesões

- Figura 1 Cromatograma do óleo essencial de alecrim, evidenciando os picos referentes aos compostos alpha-pinene (pico 1; camphene (pico 2), o-cymene(pico 7), D-limonene (pico 8); 1-8 cineol (pico 9), 2 β -myrcene (pico 11), camphor (pico 14), Isoborneol (pico 16) e α -terpieol (pico 18)..... 48
- Figura 2 Cromatograma do óleo essencial de manjerona demonstrando os compostos 3-thujene (pico 1), β -phellandrene (pico 3), β -myrcene (pico 5), 4-carene (pico 7), o-cymene (pico 8), 5-isopropyl-2-methylbicycl 2- hexanol (pico 13), γ -terpinene (pico 15), 4-terpineol (pico 16), α -terpineol (pico 17), 4- acetate terpinene 21), β -caryophyllene (pico 22), Elixene (pico 23), Methyltetradecanoate (pico 25), PalmiticacidmethylEster (pico 26) e Nonadecanoicacid methyl Ester (pico 28)..... 49
- Figura 3 Cromatograma do óleo essencial de orégano, evidenciando os compostos β -terpinene (pico 3), β -pinene (pico 4), (+)-4-carene (pico 6), o-cymol (pico 7), (+)-sylvestrene (pico 8), γ -terpinene (pico 11), 2-carene (pico 13), 5-isopropyl-2-methylbicyclo [3.1.0] hexan-2-ol (pico 14), 4-terpineol (pico 17), α -terpineol (pico 18), Thymolmethylester (pico 21), Hidroxy-p-cymene (pico 24), β -caryophyllene (pico 29), γ -elemene (pico 31), Methylpalmitate (pico35)..... 49

Figura 4	Percentual de resistência de bactérias Gram negativas isoladas de lesões cutâneas de cães frente aos antibióticos Ampicilina (AMP), Amoxicilina (AMO), Cefalexina (CEFA), Ceftriaxona (CEFT), Enrofloxacina (ENRO), Neomicina (NEO), Oxacilina (OXA), Penicilina G (PEN).....	52
Figura 5	Percentual de resistência de bactérias Gram positivas isoladas de lesões cutâneas de cães frente aos antibióticos Ampicilina (AMP), Amoxicilina (AMO), Cefalexina (CEFA), Ceftriaxona (CEFT), Enrofloxacina (ENRO), Neomicina (NEO), Oxacilina (OXA), Penicilina G (PEN).....	54

ARTIGO 3 Utilização de (1-3) β -glucana em esporotricose canina causada por *Sporothrix brasiliensis* refratária ao Itraconazol

Figura 1	Patient upon arrival for clinical examination, showing destruction of the nasal planum with secondary contamination.....	73
Figura 2	Patient after the treatment with itraconazole along with (1–3) β -glucan.....	74

Lista de Tabelas

ARTIGO 1 Avaliação *in vitro* de óleos essenciais da família Lamiaceae e extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* em bactérias isoladas de lesões cutâneas de cães

Tabela 1	Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais de alecrim, manjerona e orégano ($\mu\text{g/mL}$) frente a bactérias Gram positivas isoladas de lesões cutâneas de caninos atendidos no HCV – UFPel.....	45
Tabela 2	Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais de alecrim, manjerona e orégano ($\mu\text{g/mL}$) frente a bactérias Gram negativas isoladas de lesões cutâneas de caninos atendidos no HCV – UFPel.....	47

ARTIGO 2 Avaliação do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* frente ao *Sporothrix brasiliensis*

Tabela 1	Resultados do teste de microdiluição em caldo (CIM e CFM) avaliando a atividade do extrato hidroalcoólico de <i>Bauhinia forficata</i> e o antifúngico padrão itraconazol frente a isolados de <i>Sporothrix brasiliensis</i>	66
----------	---	----

Sumário

1	Introdução.....	15
2	Objetivos.....	17
2.1	Objetivo geral.....	17
2.2	Objetivos específicos.....	17
3	Revisão Bibliográfica.....	18
3.1	Microrganismos de Importância em Dermatologia.....	18
3.1.1	Bactérias e resistência na dermatologia Veterinária.....	19
3.1.2	Antibacterianos utilizados na dermatologia Veterinária.....	22
3.1.3	Fungos na dermatologia Veterinária.....	25
3.1.3.1	Esporotricose e <i>Sporothrix brasiliensis</i>.....	26
3.1.4	Antifúngicos na dermatologia Veterinária.....	29
3.2	Plantas medicinais.....	31
3.2.1	<i>Bauhinia forficata</i>.....	33
3.2.2	<i>Origanum vulgare</i> L.....	34
3.2.3	<i>Origanum majorana</i> L.....	36
3.2.4	<i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	37
4	Artigos.....	38
4.1	Artigo 1.....	38
4.2	Artigo 2.....	60
4.3	Artigo 3.....	71

5 Considerações Finais.....	77
Referências.....	79
Apêndice.....	94

1 Introdução

As afecções do sistema tegumentar possuem grande importância na clínica de pequenos animais, representando cerca de 30 a 40% dos casos presenciados na clínica médica (MOTTIN, 2008; MATOS et al., 2012). Segundo MENESES et al. (2000), as principais dermatopatias de cães e gatos, em ordem decrescente de ocorrência, de acordo com a etiologia, são bacterianas, parasitárias e fúngicas.

Entre os principais agentes etiológicos bacterianos, estão os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, sendo o *Staphylococcus pseudintermedius* de alta ocorrência (MATOS et al., 2012). Enquanto que, em relação as infecções fúngicas, destaca-se a esporotricose, como uma micose subcutânea emergente em animais (SOUZA et al., 2009). De acordo com RODRIGUES et al. (2013), dentro do complexo *Sporothrix*, *S. brasiliensis* vem sendo diagnosticado em 96% dos casos de esporotricose felina no Brasil.

A instituição de uma terapia adequada, nos quadros de etiologia bacteriana, é prejudicada quando o antibiótico de primeira escolha não é eficaz, e a sua escolha torna-se limitada quanto mais resistente se apresentar a bactéria (SALAZAR, 2011). A resistência bacteriana aos antimicrobianos é fonte de preocupação para a medicina humana e veterinária, sendo o uso impróprio e abusivo dos antibióticos uma das principais causas do surgimento e seleção de bactérias resistentes, que vem se disseminando mundialmente (MEIRELES, 2008), tornando-se um problema de saúde pública (MOTA et al., 2005).

O complexo *Sporothrix* vem sendo estudado quanto a diferenças de patogenicidade e sensibilidade *in vitro* (OLIVEIRA et al., 2011), sendo que algumas espécies tem demonstrado maior resistência ao itraconazol, antifúngico de eleição para esporotricose (SCHUBACH et al., 2004). Além disso, tem sido reportada a perpetuação desta, especialmente em felinos domésticos, devido principalmente ao longo tempo de tratamento e abandono da terapia, associado às falhas terapêuticas por conta de resistência, o que traz grande preocupação à área médica (GIORDANI, 2013; LAVADOURO et al., 2013).

Diante da problemática da resistência por parte dos microorganismos aos antibióticos e antifúngicos utilizados para o tratamento das dermatopatias em veterinária, muitas pesquisas tem se focado na busca de novas moléculas ou novas opções terapêuticas, como alternativas aos tratamentos já pré-estabelecidos (HAIDA et al., 2007; SILVA, 2011; GIORDANI, 2013; SANTIN, 2013). Destacando-se aquelas utilizando extratos vegetais com fins profiláticos e curativos em infecções bacterianas e fúngicas (PORTE & GODOY, 2001; HAIDA et al., 2007; CLEFF, 2008; SILVA, 2011; SANTIN, 2013; GIORDANI, 2013).

Estudos têm demonstrado atividade antimicrobiana de plantas da família Lamiaceae, como *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*, e da família Fabaceae, como a *Bauhinia forficata* (FETROW; ÁVILA, 2000; SOUZA et al., 2000; PORTE & GODOY, 2001; SILVA & FILHO, 2002; INDIANARA et al., 2008; CLEFF, 2008; SILVA, 2011; ROMERO et al., 2012; SANTIN, 2013; MATOS, 2014). Sendo que em algumas espécies vegetais o uso popular está tradicionalmente consolidado no tratamento de diversas infecções e serve como guia para pesquisas farmacológicas (MICHELIN et al., 2005).

Os extratos de plantas da família Lamiaceae, vêm demonstrando atividade no que diz respeito às propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, cicatrizantes, estimulantes do sistema nervoso, entre outras ações (LAMBERT et al., 2001; CLEFF et al., 2008). Segundo uso popular e literatura, dentre as espécies da família Fabaceae, *Bauhinia forficata* destaca-se por apresentar ação hipoglicemiante, antibacteriana, fungicida, antidiarreica, antiviral, analgésica e até anti-tumoral (MENESES et al., 2007). Assim como, ação no tecido cutâneo, levando a redução do prurido, eritemas, edemas, formação de comedões, pústulas e até micro-cistos (MENESES et al., 2007).

Devido à atual e crescente problemática da resistência dos microorganismos, em adição à atividade antimicrobiana das plantas citadas, torna-se essencial a busca por novas alternativas terapêuticas que tenham ação antibacteriana e antifúngica, investindo-se desta forma em pesquisas acerca do uso de extratos vegetais.

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Determinar a atividade de extratos vegetais em bactérias multirresistentes e fungos do complexo *Sporothrix* isolados de lesões cutâneas de animais.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar bactérias provenientes de lesões cutâneas de pequenos animais
- Traçar um perfil de resistência das bactérias isoladas de lesões cutâneas de pequenos animais e do complexo *Sporothrix*
- Avaliar a atividade *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* e óleo essencial de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis* frente a bactérias multiresistentes
- Avaliar a atividade *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* frente a *Sporothrix brasiliensis*
- Identificar os principais compostos químicos dos extratos que obtiverem os melhores resultados *in vitro*
- Relatar a utilização de (1-3) β -glucana associada ao itraconazol em esporotricose canina causada por *Sporothrix brasiliensis* refratário ao itraconazol

3 Revisão de literatura

3.1 Microrganismos de Importância em Dermatologia

A presença de bactérias em uma lesão cutânea não significa necessariamente infecção, sendo que a maioria das feridas quando manejadas corretamente evolui bem, porém fatores relacionados ao paciente como idade, imunossupressão, doenças concomitantes, tipo, quantidade e patogenicidade dos microrganismos presentes, influenciam a evolução do quadro (ARIAS et al., 2008). Inúmeros agentes podem estar envolvidos nas dermatopatias, como bactérias, parasitas e fungos, levando a diferentes quadros clínicos, tanto localizados quanto disseminados (MATOS et al., 2012).

Dentre os principais agentes etiológicos bacterianos na dermatologia de pequenos animais estão os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, destacando-se a espécie *Staphylococcus intermedius* na maioria dos casos de piodermite canina (BARBOSA et al., 2011). Isolados de *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp tem sido comumente descritos como agentes causadores de piodermites secundárias, em que já há uma injúria na pele, alterando a resistência da mesma e com isso, possibilitando a proliferação bacteriana (PENA, 2007; CONTE, 2008). Segundo MENDES (2008), o gênero *Staphylococcus* sp faz parte da microbiota residente da pele, e possui facilidade de multiplicação por alteração das populações de outras bactérias, podendo ser isolado com maior frequência nas feridas de cães e gatos.

As enfermidades fúngicas vêm crescendo na clínica de pequenos animais, destacando-se pacientes que apresentam fatores predisponentes e/ou infecções bacterianas associadas, aumentando as dificuldades de controle do quadro clínico (MATOS et al., 2012). Algumas circunstâncias podem favorecer as infecções micóticas, tais como a administração prolongada de antibióticos, terapia com corticosteróides, terapia imunossupressiva, fármacos citotóxicos e deficiências imunes (CARTER, 1988).

Dentre as diferentes espécies fúngicas de importância clínica em pequenos animais, destacam-se *Malassezia pachydermatis*, como agente de otites e

dermatites, os dermatófitos como *Mycrosporium canis*, encontrado na microbiota de felinos, e fungos do complexo *Sporothrix schenckii*. Este último acomete o tecido subcutâneo e tem sido relatado como emergente na região sul do Rio Grande do Sul (MULLER & KIRK, 2003; MADRID, 2007; MADRID et al., 2010).

Em adição, infecção mista pode ocorrer, como descrito por MATOS e colaboradores (2013) em um caso de dermatite multifatorial em um cão, envolvendo *Demodex canis*, *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp e o complexo *Sporothrix schenckii*, demonstrando o possível envolvimento concomitante destes agentes etiológicos em um mesmo paciente. KEMPFER (2010), ao avaliar 79 culturas provenientes de secreção cutânea de cães, observou que 23 eram polimicrobianas, incluindo diversos gêneros bacterianos.

3.1.1 Bactérias e resistência na dermatologia Veterinária

Dentre as afecções na clínica de animais de companhia, as lesões cutâneas destacam-se pela alta frequência, e em sua grande maioria decorrentes de mordidas e atropelamentos (ARIAS et al., 2008). Grande parte das feridas torna-se infectada, não respondendo ao tratamento preconizado (ARIAS et al., 2008). Além disso, a instituição de terapia adequada pode ser atrasada quando o antibiótico de primeira escolha não é eficaz, e a escolha deste torna-se mais limitada quanto mais resistente se apresentar a bactéria (SALAZAR, 2011).

ARIAS et al., (2008), realizou um estudo no qual acompanhou 18 pacientes com ferimentos de origem traumática que não apresentaram boa evolução do quadro com o tratamento tópico e sistêmico instituído, sendo os bacilos Gram negativos detectados em 70 % dos casos, com predominância do gênero *Pseudomonas* (30%), seguido por *Proteus* (20%). Dentre os Gram positivos, que ocorreram em 30% dos casos, *Staphylococcus* e *Streptococcus* foram isolados com igual frequência. O mesmo ocorreu com os microrganismos Gram positivos isolados por KEMPFER (2010), MENDES (2008) e SANTOS et al. (2005), em que se destacaram os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus*, já os microrganismos Gram negativos isolados com maior frequência das feridas foram *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp. e *Escherichia coli*.

Segundo Amalsadvala e Swaim (2006), podem existir vários tipos de microrganismos em um mesmo ferimento, sendo *Pseudomonas* sp, *Streptococcus*

sp. e *Staphylococcus sp.* os principais. No estudo realizado por KEMPFER (2010), das 79 culturas analisadas provenientes de secreção de pele, 23 foram consideradas polimicrobianas e 56 monomicrobianas.

OLIVEIRA (2005) cita as espécies *Staphylococcus intermedius* e *Pseudomonas aeruginosa* como as mais isoladas de otites em cães, assim como SANTOS et al. (2005), que cita 100% de isolamento e resistência de *Pseudomonas* aos antibióticos testados no seu experimento. Segundo KRUTH (2006), a terapia contra esta bactéria é extremamente difícil, devido à ocorrência de resistência natural e adquirida, sendo a gentamicina, amicacina e a ciprofloxacina potencialmente eficientes contra este agente, enquanto que a enrofloxacin é ineficaz em muitos casos.

Segundo OLIVEIRA et al. (2005), nos cães otopatas, *Pseudomonas aeruginosa* foi resistente à maioria dos antibióticos testados, sendo o melhor resultado obtido com ciprofloxacina, seguido de tobramicina e imipenem. Em medicina veterinária, os aminoglicosídeos e as quinolonas têm mostrado boa efetividade contra *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de otite externa canina, sendo apontadas como fármacos de eleição (FARIAS, 2002).

ARIAS et al., (2008), cita baixa suscetibilidade das bactérias encontradas na pele aos antimicrobianos testados em seu estudo (7% a 58,33%), enfatizando a necessidade e obrigatoriedade da realização de antibiogramas em bactérias isoladas de animais com ferimentos infectados. Dentre os microrganismos Gram negativos isolados, os gêneros *Acinetobacter*, *Proteus*, e *Pseudomonas*, foram resistentes a 14 antibióticos testados, sendo que nenhum antibiótico testado nas bactérias Gram negativas apresentou eficácia maior do que 50% (ARIAS et al., 2008). Nos antibióticos avaliados em mais de quatro isolados bacterianos, houve 100% de resistência à amoxicilina + ácido clavulânico, cefalexina e cefalotina, enquanto que observou-se 35,7% de sensibilidade à enrofloxacin, 40% à gentamicina, 41,6% à ciprofloxacina e 50% à amicacina (ARIAS et al., 2008).

Considerando-se os antibióticos testados em quatro ou mais isolados Gram positivos, a amoxicilina + clavulanato apresentou eficácia de 75%, seguido pela cefalexina, que apresentou eficácia de 66,7% (ARIAS et al., 2008). Ao avaliar-se a sensibilidade das bactérias conjuntamente, o melhor índice foi obtido com o uso de norfloxacina (58,33%), enquanto que medicamentos como amoxicilina + clavulanato,

cefalosporina e sulfazotrim apresentaram no máximo 25% de eficácia (ARIAS et al., 2008).

Nos antibiogramas realizado por OLIVEIRA et al. (2005), os melhores resultados para *Staphylococcus* coagulase negativa foram os que utilizaram quinolonas, netilmicina e betalactâmicos (com exceção de ampicilina, penicilina e oxacilina). Para *Staphylococcus* coagulase positiva, os melhores resultados foram obtidos com cefoxitina, amoxicilina- ácido clavulânico, imipenem, netilmicina e cefotaxima. Neste trabalho observaram-se, ainda, 33,3% de *Staphylococcus* resistentes à oxacilina, um dado importante já que a transmissão zoonótica de isolados de *Staphylococcus* de animais de estimação para o homem já foi descrita na literatura (WEESE et al., 2006; GEORGIEVA, 2012). Considerando-se a ocorrência de isolados de *Staphylococcus* resistentes à oxacilina na medicina veterinária, e sabendo-se que esta é considerada a droga de escolha no tratamento de infecções estafilocócicas graves no homem, a possibilidade de transmissão zoonótica de isolados de *Staphylococcus* resistente à oxacilina indica a necessidade de monitorar os perfis de isolamento e susceptibilidade aos antimicrobianos na prática veterinária (OLIVEIRA et al., 2005).

Atualmente a resistência bacteriana aos antimicrobianos é fonte de preocupação para a medicina humana e veterinária, sendo o uso impróprio e abusivo dos antibióticos uma das principais causas do surgimento e seleção de bactérias resistentes, que vêm se disseminando por todas as regiões do planeta (MEIRELES, 2008). A resistência aos antimicrobianos é inerente às bactérias, tendo sido identificada na medicina humana dois anos após a introdução da penicilina em 1941 (ARIAS et al., 2012), sendo causada basicamente pela evolução das bactérias, pela mutação espontânea e recombinação de genes, que criam variabilidade genética sobre a qual atua a seleção natural aos mais aptos (ANDRADE, 2002). Historicamente, a resistência aos antimicrobianos era determinada pela ausência de resposta clínica à administração de medicamentos (MANTESE, 1999). Porém, atualmente métodos laboratoriais podem prever essa resposta, ao testar *in vitro* a sensibilidade de isolados clínicos aos antimicrobianos e ao dosar as concentrações do fármaco no soro e em outros fluidos do hospedeiro (AGOSTINIS et al., 2012). Assim como, o uso abusivo de antimicrobianos em seres humanos gera resistência nestes indivíduos, o mesmo ocorre com o mau uso em animais (SINGER et al., 2003).

Tratando-se da instituição de uma terapia sistêmica, a prescrição adequada do fármaco deve ser baseada nos testes de identificação bacteriana, na capacidade do fármaco em atingir a concentração adequada na pele e principalmente nos testes de sensibilidade do microrganismo ao fármaco (VIEIRA, 2012).

3.1.2 Antibacterianos utilizados na dermatologia Veterinária

Segundo PAVLETIC & TROUT (2006), os antibióticos mais indicados para tratamento das infecções cutâneas ou dermatopatias são os bactericidas de amplo espectro como cefalosporinas, amoxicilina + clavulanato e fluorquinolonas. O grupo dos aminoglicosídeos é utilizado em casos mais graves, em que há risco de vida para o paciente, com exceção do antibiótico neomicina de uso tópico (VIEIRA, 2012).

Os antibióticos beta-lactâmicos ou beta-lactaminas constituem um grupo de fármacos com um grupamento químico denominado anel betalactâmico. Pertencem a esse grupo as penicilinas, cefalosporinas, cefamixinas, oxicefamixinas, amidinopenicilinas, carbapemênicos, ácido clavulânico, sulbactam e os antibióticos monobactâmicos (ANDRADE, 2002). Esta classe de drogas apresenta um amplo espectro de ação com toxicidade baixa para o hospedeiro, sendo rotineiramente administrados por via oral, permanecendo acessíveis, facilitando desta forma a sua administração (VIEIRA, 2012). Os isolados que apresentam resistência à meticilina ou oxacilina, podem se apresentar sensíveis aos β -lactâmicos *in vitro*, mas são realmente resistentes a toda esta classe de drogas *in vivo* (MAY, 2006).

Os antibióticos β -lactâmicos atuam nas bactérias através da ligação com proteínas ligadoras de penicilina (PLP), que são enzimas catalisadoras da síntese da parede celular da bactéria (MANTESE, 1999, TAVARES, 2000). A resistência ocorre pela alteração das PLPs, o que resulta em uma diminuição da afinidade dessas enzimas a esses antibióticos (TAVARES, 2000). Alguns autores tem citado maior percentual de resistência de isolados cutâneos de caninos, frente à ampicilina e penicilina (GEORGIEVA et al., 2012).

As cefalosporinas possuem atualmente cinco gerações (MIMICA, 2011), entretanto as de primeira geração continuam sendo os antimicrobianos de eleição na maior parte das infecções cutâneas e de tecidos moles, devido à sua atividade predominantemente contra cocos Gram positivos (RODRIGUES et al., 2007). As

cefalosporinas de segunda geração são ativas contra as bactérias sensíveis às cefalosporinas de primeira geração, com a vantagem de ampliar seu espectro contra as bactérias Gram negativas e alguns anaeróbios (RODRIGUES et al., 2007). As cefalosporinas de terceira geração são utilizadas em infecções por Gram negativos em pacientes hospitalizados, infecções pós-operatórias deferidas e nas infecções por *Pseudomonas* sp., já as de quarta geração, têm o seu uso preferencialmente hospitalar, naquelas infecções causadas por bactérias altamente resistentes a outros antimicrobianos, especialmente bactérias Gram positivas e Gram negativas produtoras de beta-lactamases (RODRIGUES et al., 2007).

As cefalosporinas de quinta geração, o ceftobiprole, possuem ótima ação contra *Staphylococcus aureus*, incluindo os isolados resistentes à oxacilina, além de outros Gram positivos, Gram negativos, e também anaeróbios, porém o seu uso ainda não está disponível na prática clínica (MIMICA, 2011).

Segundo SILVA et al. (2014), dentre os antibióticos, as cefalosporinas são os antimicrobianos de primeira escolha e utilizados com maior frequência no tratamento das piodermites, entretanto, frente a infecções cutâneas causadas por *Staphylococcus* sp. resistentes à meticilina ou oxacilina, as cefalosporinas deixam de constituir opções terapêuticas, o que restringe a seleção dos fármacos.

Outro grupo que se destaca são os aminoglicosídeos que são antibióticos comumente usados em infecções bacterianas por Gram negativas aeróbicas (SOUZA et al., 2008). Este grupo de antibióticos é parte importante do arsenal terapêutico antibacteriano desde seu descobrimento, na década de 40, através de uma cepa de *Streptomyces griseus*, que produzia uma substância que inibia o crescimento do bacilo da tuberculose e de diversos microorganismos Gram positivos e Gram negativos, sendo que, em 1944, a estreptomicina foi isolada (OLIVEIRA et al., 2006; SOUZA et al., 2008).

Todos os aminoglicosídeos agem pelo mesmo mecanismo de ação, penetrando no interior da célula bacteriana e interagindo com a superfície celular, deslocando competitivamente Ca^{2+} e Mg^{2+} , que mantêm a união entre as células, formando "buracos" na parede celular e alterando a permeabilidade da membrana (OLIVEIRA et al., 2006; SOUZA et al., 2008). A partir disso ocorre o acoplamento com o ribossomo, através da subunidade 30S, diminuindo a síntese protéica e levando à leitura incorreta do RNA mensageiro, causando desta forma alteração no funcionamento da membrana celular com saída de constituintes essenciais ao

funcionamento da célula, provocando a morte celular (OLIVEIRA et al., 2006; SOUZA et al., 2008). Os aminoglicosídeos têm atividade predominante sobre organismos Gram negativos, como o gênero *Pseudomonas*, sendo as bactérias anaeróbicas mais resistentes ao efeito antibacteriano (COSTA, 1999).

Entretanto, devido ao elevado potencial tóxico deste grupo, o seu uso fica restrito, podendo aumentar o tempo de hospitalização do paciente quando há intoxicação (OLIVEIRA et al, 2006). Os efeitos tóxicos mais importantes são nefrotoxicidade, ototoxicidade e bloqueio neuromuscular (OLIVEIRA et al, 2006). A nefrotoxicidade por aminoglicosídeo causa insuficiência renal aguda, não oligúrica e queda na filtração glomerular, geralmente ocorrendo após sete dias de tratamento, sendo a evolução para insuficiência renal oligo-anúrica e/ou diálise dependente considerada rara (OLIVEIRA et al, 2006; SOUZA et al., 2008). As injúrias renais são induzidas pelo acúmulo dos aminoglicosídeos nas células nefróticas, inclusive nas células mesangiais, causando uma desregulação nos mecanismos fisiológicos das filtrações glomerular e tubular, além de aumentar os níveis de creatinina sérica, edemas intracelulares, apoptose e necrose das células do túbulo proximal (SOUZA et al., 2008).

Os aminoglicosídeos mais comumente utilizados e conhecidos são: estreptomicina, neomicina, amicacina, gentamicina, canamicina, tobramicina, netilmicina, aprimicina e espectinomicina (QUEIROZ, 2008). Os únicos usados em qualquer extensão na clínica veterinária é a amicacina, e gentamicina e a neomicina, esta por sua vez, muito tóxica para ser usada de forma sistêmica, sendo utilizada topicamente no tratamento de algumas doenças de pele (ALMENARA et al., 2008). Embora os aminoglicosídeos sejam bactericidas, eles são reservados para os casos de infecções com risco de vida com poucas opções de antibióticos (VIEIRA, 2012).

As fluoroquinolonas possuem grande utilização na medicina veterinária, sendo comumente usadas como terapêutica inicial em casos de piodermites, por possuírem ação contra microorganismos G⁻, G⁺, com as últimas gerações atuando em bactérias anaeróbias, sendo a sua ação fundamental, sobretudo em infecções causadas por microorganismos resistentes a outras classes de fármacos (VIEIRA, 2012; SOUZA & VASCONCELOS, 2005). A principal representante deste grupo é a enrofloxacin com uso exclusivo em medicina veterinária (SILVA & HOLLENBACH, 2010). As fluoroquinolonas atuam por inibição da atividade catalítica de duas enzimas responsáveis e essenciais à replicação e transcrição do DNA bacteriano: a

DNA girase e a topoisomerase IV (SCHOLAR, 2002; SOUZA & VASCONCELOS, 2005).

Devido ao uso exacerbado de fluorquinolonas na última década, a incidência de isolados resistentes aumentou (VIEIRA, 2012). Os mecanismos de resistência frente às quinolonas ocorrem por alterações nas moléculas alvo: as enzimas DNA girase e topoisomerase IV e alterações da acumulação intracelular dos antibióticos (SILVA & HOLLENBACH, 2010).

Segundo MAY (2006), antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas constituem boas escolhas no tratamento do pioderma canino o que está de acordo com os resultados de PEDERSEN et al. (2007), que obtiveram somente 1,2% de resistência *in vitro* à enrofloxacin em 84 amostras de *Staphylococcus* spp. avaliadas.

Ao contrário das quinolonas de primeira geração, a administração clínica das fluoroquinolonas produz mutantes resistentes numa frequência ainda bastante pequena (SILVA & HOLLENBACH, 2010), no entanto, POMBA-FÉRIA et al. (2002) cita a resistência de *Pseudomonas* sp isoladas de felinos frente ao tratamento com enrofloxacin. Clinicamente, a resistência às fluorquinolonas foi observada nos casos de subdose ou tempo de tratamento inadequado (VIEIRA, 2012).

3.1.3 Fungos na dermatologia Veterinária

Nas últimas décadas, a utilização crescente de terapias imunossupressivas, o uso abusivo de antibióticos, o surgimento de infecções retrovirais, em humanos e animais, foram decisivas para a emergência de doenças oportunistas, sendo as enfermidades fúngicas uma das mais importantes (GOMES et al., 2012). *Malassezia pachydermatis* é um exemplo de levedura oportunista, já que é comensal da pele, meato acústico externo e mucosas de diferentes espécies animais, porém quando há alterações, como aumento da temperatura, umidade e substrato, bem como desequilíbrio na imunidade do hospedeiro pode acarretar no aparecimento da malasseziose, que ocorre devido à multiplicação excessiva desta levedura (GUILLOT, 1999; SANTIN et al., 2014).

Em infecções fúngicas onde há uma colonização excessiva, somada a uma série de alterações na superfície da pele, pode ocorrer infecção bacteriana secundária, devido à proliferação de microrganismos bacterianos como

Staphylococcus spp e *Streptococcus* spp, dificultando e prolongando o tratamento do paciente (PENA, 2007; CONTE, 2008; VIEIRA, 2012).

MARTINS e colaboradores (2014) citam infecção bacteriana secundária a criptococose e demodicose em cão, assim como MATOS e colaboradores (2014), citam a associação de *Staphylococcus* spp e *Streptococcus* spp em um caso de demodicose e esporotricose causada pelo complexo *Sporothrix schenckii* em outro paciente. Em ambos os casos a instituição do antifúngico associado com a antibioticoterapia se fez necessário, visto que tanto as bactérias quanto os fungos podem lesar a barreira cutânea, colaborando com a manutenção da enfermidade (VIEIRA, 2012).

Dentre os agentes fúngicos causadores de dermatopatias na clínica de pequenos animais destacam-se os dermatófitos, as leveduras *Malassezia pachydermatis*, *Candida* spp e os fungos dimórficos do complexo *Sporothrix schenckii* (CLEFF, 2008; SANTIN, 2014; GALIZA et al., 2014).

Na região Sul do Rio Grande do Sul, onde foi realizado este trabalho, pôde-se observar um aumento nos casos de esporotricose felina, doença causada por fungos do complexo *Sporothrix schenckii* (MADRID, 2012).

3.1.3.1 Esporotricose e *Sporothrix brasiliensis*

A esporotricose foi primeiramente descrita por Benjamin Schenck, em 1898, o qual isolou o agente etiológico a partir de uma lesão em um humano (LACAZ et al., 2002; MADRID, 2007; MARTINS, 2012) e no Brasil a doença foi relatada em 1907. Apresenta distribuição mundial, com maior frequência em zonas de clima temperado e tropical, estando a maioria dos casos na América Central e América do Sul (HIRANO et al., 2006; MARIMON et al., 2007; MADRID, 2007; MARTINS, 2008; OLIVEIRA et al., 2011; MARTINS, 2012). É uma infecção subcutânea de evolução subaguda ou crônica causada pelo complexo *Sporothrix schenckii*, sendo a sua transmissão resultante da inoculação traumática do agente na derme por espinhos, felpas de madeiras, material vegetal, assim como por arranhadura e mordedura de animais contaminados ou por contaminação da pele com solução de continuidade (MADRID, 2007; SCHUBACH et al., 2008; LARSSON et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; MARTINS, 2012; BORGES et al., 2013).

Nos últimos anos, o felino doméstico vem sendo reconhecido como de grande importância na transmissão desta micose, por carrear o fungo nas unhas e cavidade oral (SCHUBACH et al., 2001, SOUZA et al., 2006), por apresentarem grande número de organismos fúngicos nas lesões, podendo transmitir a doença mesmo quando aparentemente estão sadios (MADRID, 2007)

A micose, em felinos, já foi documentada no Brasil, nos estados de São Paulo, Mato Grosso, Rio de Janeiro, Minas Gerais, Rio Grande do Sul e Paraná (MADRID, 2007). No Rio Grande do Sul, mais especificamente no litoral sul, casos zoonóticos envolvendo felinos domésticos têm sido frequentemente relatados (MADRID, 2007), sendo os primeiros casos descritos na cidade de Rio Grande e posteriormente, na cidade de Pelotas, sendo no período de 2004 a 2006 diagnosticados 13 casos de esporotricose em felinos no RS, cujas cidades eram Pelotas (69,2%), Pedro Osório (23%) e Rio Grande (7,8%) (MADRID, 2007).

A região litorânea do sul do estado do Rio Grande do Sul apresenta significativa casuística (MADRID et al., 2010), e em menor escala ocorrem casos na região central e oeste deste estado (ALVES et al., 2010).

A esporotricose é considerada rara em cães, sendo o primeiro caso de esporotricose canina descrito no Brasil, em 1964, por LONDERO et al.,. Posteriormente poucos casos de esporotricose em cães foram descritos, entretanto, recentemente, SCHUBACH et. al. (2006) descreveram um surto com 44 casos de esporotricose cutânea canina, no Rio de Janeiro, nos quais a transmissão por gatos com esporotricose ocorreu em 84,1% dos animais, o que enfatiza o potencial do felino como transmissor desta doença.

No Brasil, em estudo realizado no Rio de Janeiro, no período de 1998 a 2004, envolvendo 1.567 animais acometidos pela esporotricose, apenas 64 animais eram caninos, sendo 1.503 felinos (SCHUBACH et al., 2008; LARSSON, 2011). A proporção de casos caninos em relação à de felinos, tanto em São Paulo como no Rio de Janeiro, é da ordem de 1:25 casos (SCHUBACH et al., 2008; LARSSON, 2011).

A esporotricose pode se apresentar nas formas cutânea, linfocutânea e disseminada, sendo a forma cutânea caracterizada pela formação de eritema, nódulos de consistência firme ou flutuante que posteriormente evoluem para uma lesão com centro necrótico-ulcerado, podendo drenar exsudato de aspecto serosanguinolento de coloração castanho avermelhado originando crostas

(SCHUBACH, 2000; MEINERZ et al., 2007; MARTINS, 2012). Nas espécies canina e felina, as lesões distribuem-se principalmente pela região cefálica, porção distal dos membros e base da cauda, comumente observando-se linfadenopatia regional ou generalizada (MARQUES et al, 1993; MARIMON et al., 2007; LARSSON et al., 2011; MARTINS, 2012; BORGES et al., 2013).

Durante muito tempo, considerou-se apenas uma espécie patogênica causadora da esporotricose, dentro do gênero *Sporothrix*, identificada como *Sporothrix schenckii* (MARIMON et al., 2007). Porém, recentemente, com base em estudos genômicos, sequenciamento de DNA, morfologia, nutrição e fisiologia, *S. schenckii* passou a ser considerado como um complexo, que inclui as espécies *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. luriae*, *S. albicans* e *S. brasiliensis*, sendo esta última uma das novas espécies encontradas no Brasil e considerada altamente patogênica (MARIMON et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011; VERGARA et al., 2012).

Segundo a chave taxonômica proposta por MARIMON (2007), *S. brasiliensis* apresenta conídios sésseis pigmentados, não cresce mais de 50mm em 21 dias em ágar batata, é capaz de crescer a 37°C, não assimila rafinose e é a única espécie que não assimila sacarose. Além disto, esta espécie é a que apresenta o menor crescimento em ágar batata, a 20° e 30°C, enquanto a 37°C é a espécie que apresenta maior crescimento.

Em um estudo realizado por RODRIGUES (2010), comparou-se 161 isolados de esporotricose de diversas regiões do país, observando que todos os isolados zoofílicos foram genotipados como *S. brasiliensis*, sendo que nos últimos tempos, segundo RODRIGUES e colaboradores (2013), o *Sporothrix brasiliensis* vem sendo diagnosticado no Brasil em 96% dos casos de esporotricose felina e conseqüentemente humana devido à transmissão zoonótica existente.

No Rio de Janeiro, OLIVEIRA et al. (2011) desenvolveram um trabalho semelhante ao analisarem 246 culturas isoladas no Rio de Janeiro, no período de 1998 e 2008 e, como resultado, reclassificaram 230 delas como *Sporothrix brasiliensis*, 15 como *S. schenckii* e 1 como *S. globosa*.

Estudos realizados recentemente indicaram que a espécie filogenética *S. brasiliensis* ocorre com maior frequência nas regiões Sul e Sudeste e que a maioria das culturas isoladas (90%) foi obtida de casos clínicos de esporotricose felina (RODRIGUES, 2010).

3.1.4 Antifúngicos na dermatologia Veterinária

O tratamento de infecções micóticas em animais representa um desafio aos veterinários, uma vez que a maioria dos agentes antifúngicos sistêmicos apresenta efeitos adversos (WELSH, 2003), além do número limitado de agentes antifúngicos orais disponíveis, quando comparado ao número de fármacos antibacterianos (NOBRE et al., 2002).

Os principais fármacos antifúngicos utilizados para o tratamento da esporotricose compreendem o iodeto de potássio, anfotericina B, itraconazol, terbinafina, cetoconazol e fluconazol, sendo a escolha terapêutica dependente da forma clínica, extensão das lesões, efeitos colaterais e envolvimento sistêmico (NOBRE et al., 2002; GREMIÃO, 2010; MARTINS, 2012).

O iodeto de potássio vem sendo utilizado no tratamento dessa micose desde o início do século XX, entretanto, os felinos são bastante sensíveis às preparações de iodetos, podendo ser observados sinais de iodismo, os quais incluem anorexia, vômitos, depressão, hipotermia e colapso cardiovascular, entre outros (GREMIÃO, 2010; MARTINS, 2012). Em alguns casos, os gatos não respondem adequadamente ao tratamento com iodetos, apresentando piora do quadro clínico que pode culminar em óbito (NOBRE et al., 2001).

Devido aos efeitos adversos relacionados aos iodetos, foi recomendada a sua substituição por antifúngicos mais efetivos e seguros como os azólicos cetoconazol e itraconazol (WELSH, 2003).

Na década de noventa, o itraconazol, antifúngico do grupo dos triazóis, emergiu como alternativa terapêutica eficaz e com reduzidos efeitos adversos quando comparado aos antifúngicos normalmente utilizados no tratamento de micoses superficiais e sistêmicas em humanos e animais, sendo considerado atualmente o tratamento de eleição para felinos com esporotricose (SCHUBACH et al., 2004; SOUZA et al., 2009; GREMIÃO, 2010; MATOS, 2014).

O mecanismo de ação do itraconazol baseia-se na capacidade do fármaco de bloquear a síntese do ergosterol, um componente vital da membrana da célula fúngica celular (GREMIÃO, 2010; MARTINS, 2012). Os azóis inibem a incorporação do acetato de ergosterol, inibindo a enzima lanosterol-14- α -demetilase, por interferência no citocromo P-450 da levedura, ocasionando alterações na fluidez e permeabilidade da membrana citoplasmática do fungo, o que se traduz por inibição

do crescimento fúngico, originando alterações morfológicas que resultam em necrose celular (NOBRE et al., 2002; GREMIÃO, 2010; MARTINS, 2012). A atividade antifúngica desses fármacos é primariamente fungistática, podendo ser fungicida em doses elevadas (NOBRE et al., 2002; GREMIÃO, 2010; MARTINS, 2012).

O antifúngico tem ampla distribuição tecidual, explicando a sua ação em diferentes sítios anatômicos de infecção, contudo apresenta pouca concentração no líquido cérebro-espinhal, saliva e fluidos oculares (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004; MARTINS, 2012). A sua metabolização é hepática, sendo eliminado principalmente através das fezes e em menor quantidade na urina (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004; SOUZA et al., 2009; MARTINS, 2012).

Mesmo sendo considerado um fármaco com reduzida toxicidade, são descritos como os principais efeitos adversos anorexia, hipocalemia, náuseas, vômitos, hipertensão e cefaléia, podendo haver ainda aumento de enzimas hepáticas como a fosfatase alcalina (BUSTAMANTE & CAMPOS, 2004; SOUZA, 2009; MARTINS, 2012).

Em felinos e caninos com esporotricose a dose recomendada pode variar de 10 a 40mg/kg, sendo o tempo de tratamento prolongado e a administração do fármaco mantida por no mínimo um mês após a cura clínica em gatos (GREMIÃO, 2010; MATOS, 2014).

Apesar do tratamento com itraconazol ser efetivo em muitos pacientes, em alguns casos não se observa a resposta clínica esperada representada pelos baixos índices de cura (SCHUBACH et al., 2004; GREMIÃO, 2010). Segundo alguns autores, este fato vem ocorrendo devido ao uso indiscriminado dos azóis, fato que tem ocasionado resistência e com isso falha terapêutica e recidiva da enfermidade (SCHUBACH et al., 2004; SOUZA et al., 2009; GREMIÃO, 2010; MARTINS, 2012; MATOS, 2014). Além disto, com a descoberta de novas espécies do gênero *Sporothrix*, estas vem apresentando respostas diferentes frente aos tratamentos, onde inclui-se o itraconazol.

CROTHERS et al. (2009) descreveram o caso de um felino com esporotricose tratado com itraconazol via oral na dose de 10mg/kg/dia por um período de 4 anos sem cura clínica, já CAVALCANTI (2010) descreveu as alterações anatomopatológicas de 23 gatos com esporotricose refratária ao itraconazol (33-100 mg/dia). Estudos recentes vem demonstrando a existência de isolados resistentes a

esse antifúngico (SCHUBACH et al., 2004; MATOS, 2014), fazendo com que aumentem os estudos a cerca de novas alternativas de tratamento para essa micose.

Em vários estudos *in vitro* de susceptibilidade antifúngica de isolados clínicos de *S. schenckii*, uma vasta gama de susceptibilidade a drogas diferentes foi demonstrada, sendo que *S. brasiliensis* é a espécie que melhor responde aos fármacos, enquanto a espécie *S. mexicana* apresenta comportamento oposto (MARIMON et al., 2007; TEIXEIRA, 2011).

Em teste realizado por OLIVEIRA e colaboradores (2011), a espécie *S. brasiliensis* apresentou os menores resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) quando utilizados os antifúngicos itraconazol, terbinafina, miconazol, fluconazol, cetoconazol, anfotericina e caspofungina, em relação a outras espécies como *S. schenckii*, *S. albicans* e *S. luriae*. *S. brasiliensis* somente não apresentou menor CIM quando utilizado o antifúngico voriconazol, apresentando CIM de 8µg/mL. OLIVEIRA e colaboradores (2011), ainda citam uma maior resistência dos isolados provenientes de animais aos antifúngicos utilizados nos testes em relação com os isolados provenientes de humanos.

3.2 Plantas medicinais

A pesquisa de substâncias ativas oriundas das plantas tem despertado interesse, em função da grande diversidade de compostos com possível ação antimicrobiana (CLEFF et al., 2008). Além disto, com base na atual problemática relacionada a terapia antimicrobiana na medicina veterinária, muitos trabalhos vem sendo realizados em busca de novas moléculas ou novas opções terapêuticas, que possam substituir ou somar-se aos tratamentos já pré-estabelecidos (GIORDANI, 2013).

Dentre as pesquisas existentes, destacam-se aquelas visando a bioprospecção com extratos de plantas medicinais com fins profiláticos e curativos, em infecções bacterianas e fúngicas (CLEFF, 2008), virais (KAZIYAMA et al., 2012) parasitárias (MORAIS-BRAGA et al., 2013) e em doenças neoplásicas (OLIVEIRA et al. 2014), estando o uso popular tradicionalmente consolidado e servindo como guia para pesquisas farmacológicas nesta área (MICHELIN et al., 2005).

O aumento de infecções oportunistas em pacientes imunocomprometidos, e o aparecimento de algumas cepas de microrganismos resistentes aos antimicrobianos usualmente administrados, gerou interesse em pesquisas voltadas para agentes fitoterápicos (GIORDANI, 2004), sendo que no início da década de 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (MATOS, 2014). No Brasil, somente 20% da população consome 63% dos medicamentos disponíveis, enquanto que o restante encontra nos medicamentos de origem natural, especialmente nas plantas medicinais, a única fonte de recurso terapêutico (DI STASI, 1996).

Dentre as muitas famílias botânicas estudadas, destacam-se as família Fabaceae e Lamiaceae, por serem citadas pelo uso popular, como grandes potencialidades para pesquisas científicas (ÁVILA, 2000; SOUZA et al., 2000; PORTE & GODOY, 2001; SILVA & FILHO, 2002; INDIANARA et al., 2008; CLEFF, 2008; SILVA, 2011; ROMERO et al., 2012; SANTIN, 2013; MATOS, 2014).

A família Lamiaceae é composta por cerca de 250 gêneros e 6.970 espécies, sendo o maior centro de dispersão a região do Mediterrâneo (PORTE & GODOY, 2001; PEREIRA et al., 2012). Muitas das espécies introduzidas no Brasil são plantas medicinais e produtoras de óleos essenciais, sendo utilizadas também como condimentos ou como flores ornamentais (BARROSO, 1986; PORTE & GODOY, 2001; JAKIEMIU et al., 2010). A família Lamiaceae engloba diversas plantas aromáticas, das quais é possível extrair óleo essencial, que apresenta em sua composição química, complexa mistura de hidrocarbonetos, álcoois e compostos carbonílicos (PORTE & GODOY, 2001; JAKIEMIU et al., 2010). Dentro desta família destacam-se as plantas *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*, que vêm apresentando atividade bactericida, antioxidante, fungicida, antitumoral, dentre outras na forma de óleos essenciais e outros extratos (HAIDA et al., 2007; JAKIEMIU et al., 2010; SILVA et al., 2011; SANTIN, 2013; MATOS, 2014; RODRIGUES et al., 2014).

Os compostos químicos encontrados na família Lamiaceae são capazes de aumentar a permeabilidade da membrana citoplasmática do microrganismo, provavelmente causando uma destruição na estrutura física da membrana do mesmo (ULTEE & SMID, 2001).

A família Fabaceae é uma das maiores famílias de angiospermas, com 727 gêneros e cerca de 19.325 espécies, distribuídas em três subfamílias: Faboideae, Mimosoideae e Caesalpinioideae. A família apresenta uma distribuição mundial ampla, estando presente tanto nas florestas tropicais quanto desertos, planícies e regiões alpinas (SILVEIRA & MIOTTO, 2013).

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal desta família, encontram-se as plantas do gênero *Bauhinia*, o qual compreende aproximadamente 300 espécies (INDIANARA et al., 2008). A planta *B. forficata*, conhecida popularmente como “pata-de-vaca” utilizada na medicina popular como hipoglicemiante, vem apresentando grande interesse na área microbiológica, devido aos estudos demonstrado ação antibacteriana e antifúngica (SOUZA et al., 2000; SILVA & FILHO, 2002; INDIANARA et al., 2008).

3.2.1 *Bauhinia forficata*

Bauhinia forficata pertence à família Fabaceae, sendo uma espécie nativa da América do Sul, a qual possui distribuição na Argentina, Paraguai, Uruguai, Bolívia e Brasil, estando neste último presente no estado do Rio Grande do Sul (SILVA & FILHO, 2002; CAMACHO, 2007).

Algumas espécies do gênero *Bauhinia* são utilizadas para fins medicinais, sendo popularmente conhecidas como pata-de-vaca, unha-de-vaca, entre outros nomes (LUSA & BONA, 2009). Tais espécies podem apresentar porte arbóreo ou arbustivo e, conforme os nomes populares sugerem, apresentam uma folha fendida no meio, formando dois lobos, que a assemelham a uma pata de bovino, possuindo flores zigomorfas que variam de cor, de acordo com a espécie e subespécie, os frutos são achatados e deiscentes, em forma de vagens (LORENZI & MATOS, 2002).

De acordo com VAZ & TOZZI (2005), o gênero *Bauhinia* é bastante amplo, com cerca de 300 espécies, das quais 200 são brasileiras. Muitas delas são utilizadas como hipoglicemiantes e destacando-se *B. forficata* que é bastante empregada com esse fim (LORENZI & MATOS, 2002).

Estudos de natureza fitoquímica indicam a presença de glicosídeos, ácidos orgânicos, sais minerais, taninos, pigmentos e mucilagens nas espécies de *Bauhinia* (LORENZI & MATOS, 2002). SOUZA et al. (2004) demonstram o efeito hipoglicêmico e potencial antioxidante do flavonóide Kaempferitrina em *B. forficata*,

sendo confirmado o potencial contra diabetes por PEPATO et al. (2004) e por MENEZES et al. (2007), através de estudos com o decocto aquoso e com extrato aquoso, respectivamente. As folhas dessa espécie são consideradas, além de antidiabéticas, diuréticas (SILVA & CECHINEL FILHO, 2002) e hipocolesterolemiantes (LORENZI & MATOS, 2002). Em adição, estudos recentes com *B. forficata* atribuem propriedades anticoagulantes e antifibrinogenolíticas à mesma, enquanto que extratos de caules e cascas mostraram efetiva ação antimicrobiana, contra dermatófitos (SILVA & CECHINEL FILHO, 2002).

Segundo indicação popular e a literatura, os extratos da planta apresentam ação hipoglicemiante, antibacteriana, fungicida, antidiarreica, antiviral, analgésica e até anti-tumoral (MENEZES et al, 2007), além de ação no tecido cutâneo, levando a redução do prurido, de eritemas, edemas, formação de comedões, pústulas e até micro-cistos (MENEZES et al, 2007).

Acredita-se que a mesma apresente como principais mecanismos de ação o estímulo às células de Langerhans, modulando o comportamento imunológico/defensivo do sistema tegumentar; equilíbrio da microbiota bacteriana, bloqueio da liberação de AGL (ácidos graxos livres); redução da enzima “5-lipoxigenase”, que produz leucotrienas inflamatórias; aumento da produção de catelicidina, elemento envolvido na pró-inflamação pela síntese de citoquinas e indução da formação do tecido de granulação, responsável pelo processo cicatricial (MENEZES et al, 2007).

Em relação ao seu potencial antifúngico, estudos vêm demonstrando atividade satisfatória de *Bauhinia forficata* frente a *Epidermophyton floccosum*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* (SILVA & FILHO, 2002). A atividade antibacteriana de *Bauhinia forficata* foi também avaliada, por Souza e colaboradores (2000), que utilizaram o método de difusão radial em ágar, observando inibição do crescimento de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

3.2.2 *Origanum vulgare* L.

O orégano (*Origanum vulgare*) é uma planta aromática amplamente utilizada como condimento na culinária, pertencente à família Lamiaceae (CLEFF, 2008; ROMERO et al., 2012; MATOS, 2014). É originária da região mediterrânea e tem

apresentado resultados de destaque como agente hábil de inibição de bactérias e fungos (CLEFF, 2008; MATOS, 2014). Além das folhas usadas no tratamento popular, o óleo essencial tem demonstrando eficácia em pesquisas, principalmente como antimicrobiano (SANTIN et al., 2014).

SAEED & TARIQ (2009), cita a ação bacteriostática e bactericida de *Origanum vulgare* frente a inúmeras bactérias Gram positivas e Gram negativas, assim como a ação frente a inúmeros fungos filamentosos, como *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Trichophyton rubrum* e *Trichophyton mentagrophytes*. Em outro estudo *in vitro*, realizado por CLEFF et al. (2008), foi comprovada a atividade antifúngica do óleo essencial de orégano frente ao *Sporothrix schenckii* através da técnica de microdiluição em caldo adaptada para fitofármacos. Também foi demonstrada a atividade *in vitro* do óleo essencial de *O. vulgare* e seus componentes químicos frente a espécies de leveduras como *Candida spp.* cuja concentração com melhor atividade foi a de 3% e frente a *Cryptococcus neoformans* (MANOHAR et al., 2001; CHAMI et al., 2004; CLEFF et al., 2010).

MATOS (2014) cita atividade da infusão e do óleo essencial frente a 111 bactérias Gram positivas, assim como ação do óleo essencial e do extrato metanólico sobre uma série de espécies de bactérias deteriorantes de alimentos, observando que o óleo teve ação sobre a maioria delas, ao contrário do extrato metanólico. Na forma de extrato aquoso e de extrato alcoólico, *O. vulgare* foi testado frente a isolados bacterianos de *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Listeria*, *Salmonella* e *Shigella* através da técnica de difusão em disco, demonstrando a ação por parte do extrato alcoólico a 20% frente a *Shigella* (ALVARENGA et al., 2007).

Em relação ao óleo essencial de *Origanum vulgare*, tem sido descrito que este apresenta em torno de 34 compostos ativos, sendo que os fenóis como carvacrol, timol, gaba terpeno, e p-cimeno podem alcançar entre 80,2% e 98% da composição total, conferindo grande eficácia a este óleo, já que os compostos como gaba terpeno e p-cimeno conferem atividade antimicrobiana ao produto (RODRIGUES, 2002; CLEFF, 2008).

Além de atividade antimicrobiana do óleo essencial de *O. vulgare*, ainda são citadas atividade antimutagênica (LAM & ZHENG, 1991), antioxidante (VATTEM et al., 2005) e conservante de alimentos (OUSSALAH et al., 2007).

3.2.3 *Origanum majorana* L.

Origanum majorana L. conhecida como manjerona, é uma planta perene, cuja porção subterrânea é formada por um sistema de raízes fibrosas (SILVA, 2011). No óleo essencial de manjerona são encontrados isômeros terpênicos, e compostos fenólicos e flavonóides, além de carvacrol, timol, triacotano, sitosterol, ácido oleanólico e rosmarínico, hidroquinonas e taninos, sendo o timol e o carvacrol conhecidos como componentes majoritários destes óleos essenciais (ÁVILA, 2000; SILVA, 2011; SANTIN, 2013).

Origanum majorana L., também é mencionada na literatura como estimulante do sistema nervoso, ação analgésica, espasmolítica, sudorífica, estimulante da digestão e expectorante (MARTINS et al., 2000). Atualmente, o óleo essencial de *O. majorana* vem despertando interesse por possuir atividade antibacteriana, antifúngica e antioxidante, o que ocorre também devido à presença dos compostos fenólicos (SILVA, 2011).

Em relação à atividade antioxidante o óleo essencial de *O. majorana* apresentou o melhor resultado dentre 8 plantas testadas, sendo que em ensaios com gema de ovo, a atividade antioxidante da manjerona foi muito mais alta do que a do α -tocoferol, em todas as concentrações testadas (SANTIN, 2013).

No trabalho realizado por Busatta et al. (2008), utilizando teste *in vitro* de difusão em disco, foi encontrada CIM para o óleo essencial de *O. majorana* frente a cepas de *E. coli* e *Salmonella choleraesius* de 0,92 mg/mL e para *S. aureus* de 0,78 mg/mL. Os autores também observaram que todos os microrganismos testados foram suscetíveis à ação do óleo essencial de manjerona, com valores de CIM entre 0,069 e 2,3 μ g/mL.

A atividade antifúngica do óleo essencial de manjerona também foi testada frente ao *Penicillium digitatum*, demonstrando completa inibição, inclusive em baixas concentrações do óleo essencial (~250 μ g/mL) e, frente a diferentes espécies de *Candida*, *Aspergillus* e dermatófitos onde a CIM de 320 μ L/mL foi capaz de inibir o crescimento de 80% dos microrganismos, com halos de inibição variando de 12 a 40 mm de diâmetro (SANTIN, 2013).

Embora existam trabalhos com relação às propriedades antimicrobianas do óleo essencial de manjerona, ainda nota-se uma carência de estudos para

comprovar cientificamente os efeitos deste óleo como antibacteriano e a forma como este age nos microrganismos.

3.2.4 *Rosmarinus officinalis* L.

Rosmarinus officinalis L. conhecido como alecrim é uma planta de porte subarbustivo de até 1,5 m de altura. Nas folhas foram registradas a presença de óleo essencial constituído de cineol, alfa-pineno e cânfora, como componentes voláteis, e ácido caféico, diterpenos, flavonóides e triterpenóides, como componentes não voláteis (SIMÕES et al., 2003; SANTIN, 2013).

São citadas na literatura ação diurética, colerética, sendo empregada no tratamento sintomático de problemas digestivos diversos, carminativa, cicatrizante e antiinflamatória (MATOS, 2002; SIMÕES et al., 2003). Além disto, as propriedades terapêuticas do alecrim podem ser observadas nos casos de obstrução nasal, como antisséptico bucal e estimulante do couro cabeludo (MATOS, 2002; SANTIN, 2013). O óleo volátil é antibacteriano e antisséptico e possui capacidade de inibir o crescimento de várias bactérias e fungos, devido à presença de compostos fenólicos, aldeídos e alcoóis, sendo que os compostos citral, geraniol, linalol e timol têm alto potencial antisséptico, superior ao do próprio fenol (SIMÕES et al., 2003; SILVA et al., 2011; SANTIN, 2013).

Em óleos essenciais de alecrim, de diferentes partes do Egito, foi encontrada atividade inibitória contra os fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* e *Mycobacterium intracellulare*, assim como ação bactericida frente ao *Staphylococcus aureus* (PORTE & GODOY, 2001). Foi também observada alta sensibilidade de bactérias Gram positivas aos óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* proveniente do Egito, como *Staphylococcus aureus*, *Micrococcus sp.* e *Sarcina sp.*, bem como a levedura *Saccharomyces cerevisiae* (PORTE & GODOY, 2001). Entretanto, nenhum ou pouco efeito foi verificado contra as bactérias Gram negativas (PORTE & GODOY, 2001).

O efeito antibacteriano do extrato etanólico de alecrim frente ao *Clostridium perfringens* foi demonstrado através de teste *in vitro* de microdiluição em caldo por LUCARINI et al. (2008). Pesquisa avaliando *in vitro* o extrato de alecrim frente a microrganismos da cavidade oral sugerem a possibilidade de uso deste extrato como antimicrobiano oral (SILVA et al., 2008).

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Avaliação *in vitro* de óleos essenciais da família Lamiaceae e extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* em bactérias isoladas de lesões cutâneas de cães

Karina Affeldt Guterres, Claudia Giordani, Caroline Bohnen de Matos, Cristine Cioato da Silva, Silvia Regina Leal Ladeira, Marlete Brum Cleff

Será submetido à revista Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia

1 **Avaliação *in vitro* de óleos essenciais da família Lamiaceae e extrato hidroalcoólico**
2 **de *Bauhinia forficata* em bactérias isoladas de lesões cutâneas de cães**

3 **Essential oils *in vitro* evaluation of the Lamiaceae family and hydroalcoholic**
4 **extract of *Bauhinia forficata* in bacteria isolated from skin lesions of dogs**

5

6

Resumo

7 A resistência bacteriana aos antibióticos é cada vez mais preocupante, desta forma este
8 estudo objetivou isolar, identificar, traçar o perfil de resistência de bactérias de lesões
9 cutâneas de cães frente a antibióticos e avaliar a atividade *in vitro* de extratos da família
10 Lamiaceae e Fabaceae através do método de microdiluição em caldo. Foram isoladas
11 um total de 46 bactérias de 40 caninos do Hospital de Clínicas Veterinária da UFPel.
12 Dentre as Gram positivas foram identificadas *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S.*
13 *hyicus*, *S. xylosus*, *S. hominis*, *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus pluranimalium*, *S.*
14 *dysgalactiae*, *Enterococcus faecium*, *E. faecalis* e *Alloiococcusotitis*. Dentre as Gram
15 negativas, foram identificadas *Aeromonas hydrophila*, *Escherichia coli*, *Enterobacter*
16 *aerogenes*, *E. cloacae complex*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P.*
17 *putida*, *Proteus mirabilis* e *P. vulgaris*. Nos testes de sensibilidade frente aos
18 antibióticos, as bactérias em geral apresentaram maior resistência frente aos
19 antibióticos β -lactâmicos e maior sensibilidade à enrofloxacin. O extrato
20 hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* não apresentou atividade frente à maioria das
21 bactérias estudadas. Em relação aos óleos analisados, houve diferença estatística
22 ($p < 0,05$) entre estes, quando testado o grupo de bactérias Gram positivas, tanto para
23 CIM como CBM. O óleo essencial de alecrim foi o que obteve menor CIM e CBM (0,4
24 $\mu\text{g/mL}$), nas concentrações testadas. Os resultados obtidos com os óleos de manjerona
25 (CIM e CBM de 0,4 $\mu\text{g/mL}$) e orégano (1,9 $\mu\text{g/mL}$ de CIM e 3,9 $\mu\text{g/mL}$ de CBM) não
26 diferiram estatisticamente. Com o grupo de bactérias Gram negativas, os óleos de
27 manjerona e alecrim obtiveram menor CIM e CBM, não diferindo estatisticamente,
28 com média de 0,9 $\mu\text{g/mL}$ de CIM e CBM para alecrim e CIM de 0,4 $\mu\text{g/mL}$ e CBM de
29 1,9 $\mu\text{g/mL}$ para manjerona. O óleo essencial de orégano não diferiu estatisticamente do
30 óleo essencial de alecrim, apresentando menor CIM e CBM com média de 0,4 $\mu\text{g/mL}$.

31 Em conclusão, os óleos da família Lamiaceae, podem vir a ser uma nova alternativa
32 terapêutica, em casos de resistência bacteriana, necessitando de estudos pré-clínicos.

33 **Palavras-chave:** *Bauhinia forficata*, Dermatologia veterinária, Família Lamiaceae,
34 Resistência bacteriana

35

36

Abstract

37 Bacterial resistance to antibiotics is increasing concern, so this study aimed to isolate,
38 identify, trace the resistance profile of wounds facing dogs to antibiotics and to
39 evaluate the in vitro activity of Lamiaceae and Fabaceae family extracts by the method
40 broth microdilution. Were isolated a total of 46 bacteria of 40 canines of the Clinical
41 Hospital Veterinary UFPel. Among the Gram positive bacteria were identified
42 *Staphylococcus aureus*, *S. intermedius*, *S. hyicus*, *S. xylosus*, *S. hominis*,
43 *Staphylococcus sp.*, *Streptococcus pluranimalium*, *S. dysgalactiae*, *Enterococcus*
44 *faecium*, *E. faecalis* and *Alloiococcus otitis*. Among Gram-negative, were identified
45 *Aeromonas*, *Escherichia coli*, *Enterobacter aerogenes*, *E. cloacae complex*, *Klebsiella*
46 *pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *P. putida*, *Proteus vulgaris* and *P. mirabilis*. In
47 the sensitivity test to antibiotics front, the bacteria generally showed greater resistance
48 against the β -lactam antibiotics and increased sensitivity to enrofloxacin. The alcoholic
49 extract of *Bauhinia forficata* did not show activity against the bacteria studied.
50 Regarding the analyzed oils, was no statistical difference ($p < 0.05$) between them,
51 when tested the group of Gram positive bacteria, both MIC and CBM. The essential oil
52 of rosemary was what had lower MIC and MBC ($0.4 \mu\text{g} / \text{mL}$), in concentrations. The
53 results obtained with the marjoram oils (MIC and MBC of $0.4 \mu\text{g} / \text{mL}$) and oregano
54 ($1.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ of MIC and $3.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ of CBM) did not differ significantly. With the
55 group of Gram negative bacteria, marjoram and rosemary oils had lower MIC and
56 MBC, did not differ statistically, lying on average $0.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ of MIC and MBC for
57 rosemary and MIC $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$ and $1.9 \mu\text{g}/\text{mL}$ CBM for marjoram. The essential oil of
58 oregano did not differ statistically from the rosemary essential oil, with lower MIC and
59 MBC with an average of $0.4 \mu\text{g}/\text{mL}$. In conclusion, the Lamiaceae family of oils, may
60 become a new therapeutic alternative in cases of bacterial resistance, requiring pre-
61 clinical studies.

62 **Keywords:** *Bauhinia forficata*, Veterinary Dermatology, Lamiaceae Family, Bacterial
63 resistance

64

65 **INTRODUÇÃO**

66

67 A dermatologia na medicina veterinária é uma área em ascensão, onde 20 a 75%
68 dos atendimentos clínicos ou hospitalar de pequenos animais estão diretamente
69 relacionados a problemas de pele (Scott et al. 2001). Dentre as principais etiologias na
70 dermatologia veterinária, destacam-se as feridas traumáticas em cães e gatos, sendo na
71 maior parte casos decorrentes de mordidas de outros animais ou atropelamentos (Arias
72 et al., 2008). Muitas dessas lesões apresentam contaminação bacteriana secundária, não
73 respondendo ao tratamento preconizado (Arias et al., 2008).

74 A maioria das feridas, quando manejadas corretamente evolui bem, porém
75 fatores relacionados ao paciente (idade, imunossupressão, doenças concomitantes, tipo,
76 quantidade e virulência dos microrganismos) influenciam a evolução do quadro (Arias
77 et al., 2008). Nestes casos o médico veterinário deve decidir pela antibioticoterapia
78 mais adequada, sendo a seleção do fármaco feita com base nos sinais clínicos, tipo de
79 lesão e resultados da cultura e antibiograma (Arias et al., 2008).

80 Todavia, a instituição de uma terapia adequada, nos quadros de etiologia
81 bacteriana, pode ser atrasada quando o antibiótico de primeira escolha não é eficaz, e a
82 sua eficácia torna-se limitada quanto mais resistente se apresentar a bactéria (Salazar,
83 2011). A resistência bacteriana aos antibióticos é cada vez mais preocupante,
84 constituindo um grave problema de saúde pública, sendo explicada por French (2005),
85 como uma resposta evolutiva inevitável ao uso de antibióticos.

86 Devido a essa crescente problemática, novas pesquisas vêm sendo realizadas,
87 incluindo os estudos com extratos de plantas medicinais. A pesquisa com plantas tem
88 despertado interesse, em virtude da grande diversidade molecular dos produtos
89 naturais, que é muito superior aquela derivada dos processos de síntese, e possível ação
90 antimicrobiana (Cleff, 2008).

91 Dentre as plantas medicinais atualmente estudadas, destacam-se as pertencentes
92 às famílias Lamiaceae, como *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus*
93 *officinalis* e à família Fabaceae, como *Bauhinia forficata*. Estas plantas, em diversos

94 tipos de extratos, apresentam ação antimicrobiana, servindo como base para obtenção
95 de novas moléculas potencialmente ativas contra os microrganismos resistentes (Porte
96 & Godoy, 2001; Cleff, 2008).

97 Devido à problemática da resistência bacteriana, objetivou-se isolar e traçar o
98 perfil de resistência de bactérias provenientes de feridas de cães frente a antibióticos e a
99 extratos da família Lamiaceae e Fabaceae, assim como analisar os principais compostos
100 químicos encontrados nos extratos das plantas com maior atividade antimicrobiana.

101

102 MATERIAL E MÉTODOS

103

104 O estudo foi realizado através da coleta de secreções de lesões cutâneas
105 ulceradas de cães com *swab* estéril, atendidos durante o período de abril de 2013 a abril
106 de 2014 no Hospital de Clínicas Veterinária da UFPEL. Após, o material foi semeado
107 em placas de Petri com Ágar Sangue e Ágar MacConkey, permanecendo em estufa a
108 37°C, durante 24 horas, no Laboratório de Bacteriologia - UFPEL.

109 Após o crescimento das colônias bacterianas, foram consideradas as
110 características, como coloração, presença de hemólise e odor para caracterização
111 macromorfológicas. Na avaliação microscópica, utilizou-se a técnica de coloração de
112 Gram, observando-se a presença de cocos ou bastonetes, assim como a sua coloração.

113 A identificação do gênero e espécie bacteriana foi realizada através de provas
114 bioquímicas, sendo confirmada após pelo método automatizado Vitek® 2 GN para os
115 microrganismos Gram negativos e Vitek® 2 GP para os Gram positivos.

116 Realizada a identificação bacteriana, foram feitos os antibiogramas em placas
117 contendo Ágar Mueller-Hinton, através da técnica de Kirby-Bauer (1966), utilizando-se
118 para isto, inóculo equivalente a 0,5 na Escala de McFarland de cada bactéria a ser
119 analisada. A suscetibilidade antimicrobiana é avaliada através da medição dos halos de
120 inibição de crescimento com auxílio de uma régua (mm). Os antibióticos utilizados
121 para o teste de susceptibilidade *in vitro* foram ampicilina (10 mcg), amoxicilina (30
122 mcg), cefalexina (30 mcg), ceftriaxona (30 mcg), enrofloxacina (5 mcg), neomicina (30
123 mcg), oxacilina (1 mcg) e penicilina G (10 un).

124 Foram utilizados também exemplares de American Type Culture Collection
125 (ATCC), obtidos da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), como forma de comparação
126 com os isolados obtidos das culturas bacterianas.

127 As plantas da família Lamiaceae utilizadas no estudo foram obtidas de
128 distribuidores comerciais, com certificação de origem e qualidade. O extrato utilizado
129 destas plantas foi o óleo essencial, sendo obtido através da submissão das folhas secas à
130 extração com arraste de vapor em aparelho Clevenger, segundo a Farmacopéia
131 Brasileira IV, durante 4 horas. Na sequência, o óleo obtido de cada planta foi seco com
132 sulfato de sódio anidro p.a, armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração
133 até a utilização.

134 A identificação química dos compostos de cada óleo essencial foi determinada
135 por cromatografia gasosa de alta eficiência (HPLC) com o equipamento GC/MS
136 Shimadzu QP2010.

137 A planta *Bauhinia forficata* utilizada no estudo foi coletada no distrito do Povo
138 Novo, Rio Grande - RS, sendo encaminhada para identificação no Setor de Botânica –
139 UFPel e após seca em estufa com circulação de ar sob temperatura de 35°C. Para o
140 preparo do extrato vegetal de *Bauhinia forficata* foi utilizada a técnica descrita por
141 Schiedeck et al. (2008), afim de se obter o extrato hidroalcoólico.

142 O teste de susceptibilidade dos isolados bacterianos e ATCC's, frente aos
143 diferentes extratos foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido pelo
144 documento CLSI M7-A8 (2009), utilizando-se para isto o teste de microdiluição em
145 caldo, com modificação para fitofármacos. As concentrações do extrato hidroalcoólico
146 de *Bauhinia forficata* testadas foram de 100 a 0,195 mg/mL e dos óleos da família
147 Lamiaceae de 250 a 0,4882 µg/mL.

148 A análise estatística foi realizada com o programa Statistix 9.0, pela
149 metodologia da análise de variância (ANOVA), comparando as médias de bactérias
150 Gram positivas e Gram negativas pelo teste de Tukey em relação aos óleos analisados.
151 Valores de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

152

153

154

155

156 RESULTADOS E DISCUSSÃO

157

158 Foram identificados um total de 46 isolados bacterianos dos 40 cães com lesões
159 cutâneas atendidos no Hospital de Clínicas Veterinária da UFPel. Das bactérias, 26
160 foram classificadas como Gram positivas e 20 Gram negativas.

161 No que se refere às bactérias Gram positivas, o gênero *Staphylococcus* se
162 destacou, apresentando 73% de ocorrência, sendo a espécie *Staphylococcus*
163 *intermedius* a mais prevalente dentro do gênero, com 47% dos isolados, seguida das
164 espécies *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus xylosus*, com 21 e 16%,
165 respectivamente.

166 Em relação às bactérias Gram negativas, destacou-se o gênero *Pseudomonas*
167 com 40% dos isolados bacterianos, sendo a espécie *P.aeruginosa*, isolada em 87,5%
168 dentro do gênero. Em seguida o gênero *Proteus* e a espécie *Escherichia coli* foram os
169 mais isolados, com 20% e 15% dos isolados Gram negativos, respectivamente. Estes
170 resultados concordam com Oliveira (2006) que cita como microrganismos mais
171 frequentemente envolvidos em feridas *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus*
172 *coagulase-negativos*, *Pseudomonas sp.*, *E. coli*, *Enterobacter sp.* e *Proteus sp.*.

173 Em relação aos óleos analisados, houve diferença estatística dos resultados de
174 CIM e CBM ($p < 0,05$), quando testado o grupo de bactérias Gram positivas. O óleo
175 essencial de alecrim foi o que obteve menor CIM e CBM (0,4 $\mu\text{g/mL}$). Já os óleos de
176 manjerona e orégano não diferiram estatisticamente, com menor CIM e CBM de 0,4
177 $\mu\text{g/mL}$ para manjerona e CIM de 1,9 $\mu\text{g/mL}$ e CBM de 3,9 $\mu\text{g/mL}$ para orégano (Tab.
178 1).

179

Tabela 1. Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais de alecrim, manjerona e orégano ($\mu\text{g/mL}$) frente bactérias Gram positivas isoladas de feridas de caninos atendidos no HCV - UFPel

Isolados	Alecrim($\mu\text{g/mL}$)		Manjerona($\mu\text{g/mL}$)		Orégano($\mu\text{g/mL}$)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. intermedius</i> (n=8)	0,4-250	0,4- >250	1,9-31,2	7,8-125	1,9-15,6	3,9-31,2
<i>S. aureus</i> (n=4)	7,8-250	31,2-250	0,9-15,6	3,9-62,5	7,8-31,2	7,8-62,5
<i>S. xylosus</i> (n=3)	7,8-250	7,8-250	3,9-31,2	31,2-62,5	3,9	3,9-7,8
<i>Staphylococcus hominis</i> (n=1)	15,6	15,6	7,8	62,5	3,9	3,9
<i>Staphylococcus hyicus</i> (n=1)	250	250	31,2	31,2	7,8	125
<i>Staphylococcus sp.</i> (n=1)	7,8	125	62,5	62,5	3,9	62,5
<i>Streptococcus pluranimalium</i> (n=2)	1,9-3,9	7,8-31,2	0,4	0,4-0,9	1,9	3,9-125
<i>Streptococcus dysgalactiae</i> (n=1)	0,9	0,9	3,9	3,9	1,9	7,8
<i>Enterococcus faecalis</i> (n=2)	31,2-125	125-250	31,2-62,5	31,2-125	3,9-31,2	7,8-31,2
<i>Enterococcus faecium</i> (n=1)	15,6	31,2	15,6	15,6	31,2	31,2
<i>Alloicoccus otitis</i> (n=2)	15,6	15,6	7,8	31,2-125	1,9-3,9	3,9-7,8
* <i>Streptococcus dysgalactiae</i>	7,8	250	3,9	3,9	0,9	31,2
* <i>Enterococcus faecium</i>	62,5	125	15,6	15,6	15,6	15,6
* <i>Staphylococcus hominis</i>	0,9	0,9	62,5	62,5	15,6	15,6
* <i>Staphylococcus aureus</i>	15,6	15,6	31,2	31,2	3,9	3,9
* <i>Enterococcus faecalis</i>	62,5	62,5	31,2	31,2	15,6	15,6
* <i>Staphylococcus xylosus</i>	15,6	15,6	3,9	15,6	3,9	3,9

182 * Bactérias ATCC

183

184 Com o grupo de bactérias Gram negativas, apenas a CIM apresentou diferença
 185 entre os tratamentos, sendo os óleos de manjerona e alecrim, os que obtiveram menor
 186 CIM e CBM, nas concentrações testadas, não diferindo estatisticamente, encontrando-
 187 se 0,9 $\mu\text{g/mL}$ de CIM e CBM para alecrim e CIM 0,4 $\mu\text{g/mL}$ e CBM 1,9 $\mu\text{g/mL}$ para
 188 manjerona. O óleo essencial de orégano não diferiu estatisticamente do óleo essencial
 189 de alecrim, apresentando menor CIM e CBM de 0,4 $\mu\text{g/mL}$ (Tab. 2).

190 Os óleos essenciais da família Lamiaceae apresentaram atividade frente às cepas
 191 utilizadas, variando a CIM e CBM entre 0,9 a 250 $\mu\text{g/mL}$, não havendo diferença

192 estatística ($p>0,05$) no que se refere às cepas Gram positivas e Gram negativas para
193 CIM e CBM.

194 Lima et al. (2013) citam em seus estudos utilizando óleo essencial de
195 *Rosmarinus officinalis*, frente a 18 isolados de *Staphylococcus intermedius* de cães,
196 CBM de 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ e CIM de 2,5 $\mu\text{L}/\text{mL}$ a 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, sendo estas concentrações
197 superiores às encontradas em nosso estudo, onde CIM e CBM foram de 0,4 $\mu\text{g}/\text{mL}$
198 frente ao mesmo microrganismo.

199 Hussain et al. (2010), avaliaram as atividades antiproliferativa, antioxidante e
200 antibacteriana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*, sendo que em relação à
201 atividade antibacteriana, este apresentou CIM menor frente à *Staphylococcus aureus*
202 (0,3 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *Pseudomonas aeruginosa* (1,26 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e 2 isolados de *Escherichia coli*
203 (1,52 e 1,72 $\mu\text{g}/\text{mL}$), quando comparado a CIM do antibiótico ciprofloxacina testado no
204 mesmo experimento (6, 3, 4,8 e 5,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$).

205 Foram testados diferentes óleos essenciais de *Rosmarinus officinalis* obtidos de
206 diferentes lugares frente a bactérias, sendo os valores de CIM encontrados para
207 *Escherichia coli* de 1 - $>900 \mu\text{l}/\text{mL}$, para *Staphylococcus aureus* de 0,4 – 10 $\mu\text{l}/\text{mL}$ e
208 para *Pseudomonas aeruginosa* de $>900 \mu\text{l}/\text{mL}$ (Ribeiro, 2011).

209 Silva (2011) avaliou isolados de *Salmonella enteritidis* e *Staphylococcus aureus*,
210 utilizando óleo essencial de *Origanum majorana*, com resultados de CIM de 2,5 a 5 e 5
211 a 10 $\mu\text{L}/\text{mL}$, respectivamente, não havendo atividade bactericida (CBM).

212

Tabela 2. Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais de alecrim, manjerona e orégano ($\mu\text{g/mL}$) frente bactérias Gram negativas isoladas de feridas de caninos atendidos no HCV - UFPel

Isolados	Alecrim($\mu\text{g/mL}$)		Manjerona($\mu\text{g/mL}$)		Orégano($\mu\text{g/mL}$)	
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>P. aeruginosa</i> (n=6)	250- >250	250- >250	31,2- >250	31,2- > 250	62,5- >250	62,5- >250
<i>P. aeruginosa</i> (n=1)	7,8	15,6	7,8	15,6	3,9	62,5
<i>Pseudomonas putida</i> (n=1)	>250	>250	250	250	>250	>250
<i>E. coli</i> (n=3)	7,8	15,6- 62,5	1,9 – 3,9	1,9 – 7,8	0,4 – 1,9	1,9-15,6
<i>Proteus mirabilis</i> (n=2)	7,8-15,6	7,8-31,2	1,9 – 3,9	3,9 – 15,6	0,9	0,9
<i>Proteus vulgaris</i> (n=2)	31,2	15,6-31,2	3,9	7,8 – 31,2	0,9	3,9-7,8
<i>Aeromonas hydrophila</i> (n=1)	0,9	0,9	1,9	0,4	0,4	0,4
<i>Enterobacter Cloacae complex</i> (n=2)	7,8-15,6	15,6-125	3,9	3,9	1,9-3,9	3,9-7,8
<i>Enterobacter aerogenes</i> (n=1)	7,8	125	7,8	62,5	1,9	1,9
<i>Klebsiella pneumoniae</i> (n=1)	7,8	15,6	3,9	3,9	1,9	15,6
* <i>Klebsiella pneumoniae</i>	125	125	3,9	3,9	1,9	7,8
* <i>Enterobacter cloacae complex</i>	15,6	15,6	3,9	31,2	0,9	3,9
* <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>250	>250	250	250	>250	>250
* <i>Aeromonas hydrophila</i>	7,8	7,8	7,8	7,8	3,9	3,9
* <i>Escherichia coli</i>	15,6	62,5	1,9	15,6	0,9	1,9
* <i>Enterobacter aerogenes</i>	15,6	31,2	7,8	7,8	1,9	1,9
* <i>Proteus mirabilis</i>	7,8	15,6	3,9	15,6	0,9	3,9
* <i>Proteus vulgaris</i>	7,8	7,8	3,9	3,9	15,6	15,6

213 * Bactérias ATCC

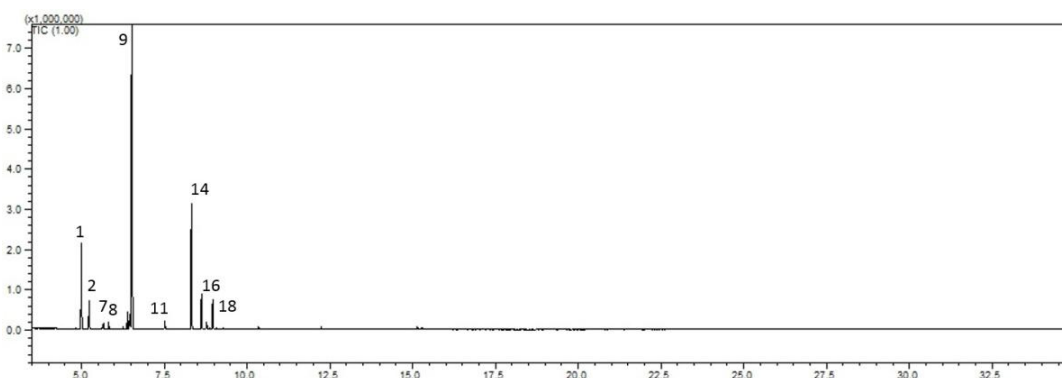
214

215 Em relação ao óleo essencial de orégano, Pozzo (2011) cita a atividade do
 216 mesmo frente a 65 isolados de *Staphylococcus spp.*, provenientes de animais, em que a
 217 CIM variou entre 800-3200 $\mu\text{g/mL}$ e a CBM de 1600-6400 $\mu\text{g/mL}$, já Santurio et al.
 218 (2011), testou *Origanum vulgare* frente a 79 amostras de *Escherichia coli*, isoladas de
 219 fezes de bovinos e aves, encontrando valores de CIM de 400 a 1600 $\mu\text{g/mL}$ e CBM de
 220 800 a 1600 $\mu\text{g/mL}$ para ambas espécies, sendo estes valores muito superiores aos
 221 encontrados em nosso estudo, em que CIM e CBM para *Staphylococcus sp.* foram de

222 0,9 µg/mL e 3,9 µg/mL, respectivamente e CIM e CBM para *Escherichia coli* foi de 0,4
223 µg/mL.

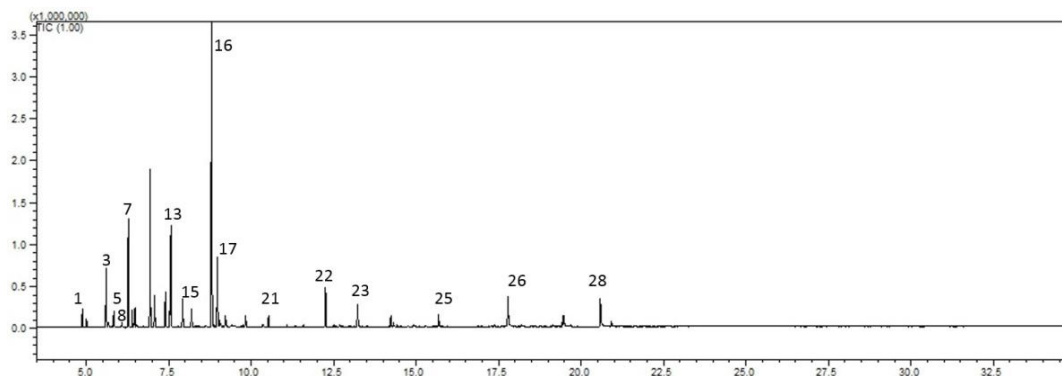
224 Embora haja exceções, em geral as bactérias Gram positivas são mais
225 susceptíveis do que as Gram negativas aos compostos lipofílicos dos óleos essenciais
226 (Busatta, 2006), o que foi observado em nosso estudo, com médias de CIM e CBM de
227 30 e 45 µg/mL para os microrganismos Gram positivos e CIM e CBM de 89 e 92
228 µg/mL para os Gram negativos (Tab. 1 e 2). Uma possível explicação para esta
229 atividade pode estar relacionada à dificuldade dos óleos essenciais em difundir a
230 membrana externa, devido a barreira hidrofílica impedir a passagem de
231 macromoléculas, embora esta não seja totalmente impermeável, determinando que as
232 bactérias gram-negativas são relativamente mais resistentes (Busatta, 2006).

233 Na análise cromatográfica, foram identificados 39 compostos químicos, sendo 9
234 compostos referentes ao óleo essencial de alecrim, onde os compostos majoritários
235 foram Eucalyptol (1-8 cineol), Camphor e Alpha-pinene (Fig. 1); 15 compostos
236 referentes ao óleo essencial de manjerona, com 4-terpineol, 4-carene e 5-isopropyl-2-
237 methylbicyclo como majoritários (Fig. 2) e 15 compostos referentes ao óleo essencial
238 de orégano, onde descaram-se o γ -terpinene, 4-terpineol e Hidroxy-p-cymene (Fig. 3).



239
240 Figura 1. Cromatograma do óleo essencial de alecrim, evidenciando os picos
241 referentes aos compostos alpha-pinene (pico 1; camphene (pico 2), o-
242 cymene(pico 7), D-limonene (pico 8); 1-8 cineol (pico 9), 2 β -myrcene (pico
243 11), camphor (pico 14), Isoborneol (pico 16) e α -terpieol (pico 18).

244



245

246

247

248

249

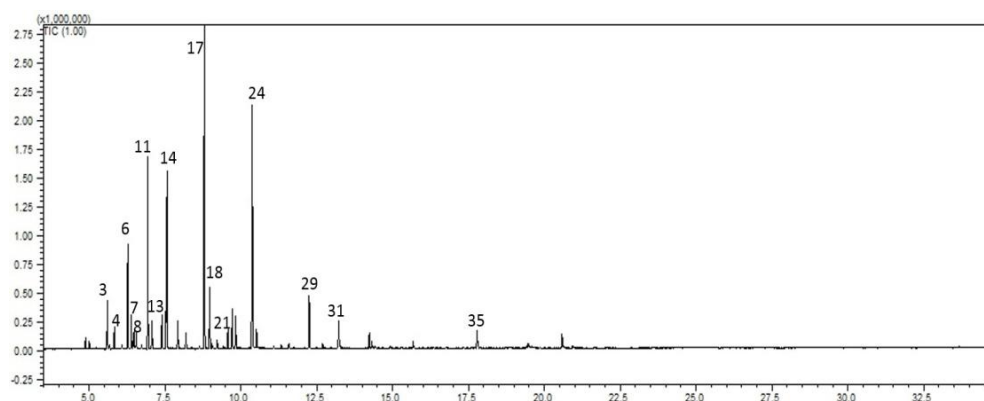
250

251

252

253

Figura 2. Cromatograma do óleo essencial de manjerona demonstrando os compostos 3-thujene (pico 1), β -phellandrene (pico 3), β -myrcene (pico 5), 4-carene (pico 7), o-cymene (pico 8), 5-isopropyl-2-methylbicycl 2- hexanol (pico 13), γ -terpinene (pico 15), 4-terpineol (pico 16), α -terpineol (pico 17), 4-acetateterpinene (pico 21), β -caryophyllene (pico 22), Elixene (pico 23), Methyltetradecanoate (pico 25), PalmiticacidmethylEster (pico 26) e NonadecanoicacidmethylEster (pico 28).



254

255

256

257

258

259

260

261

262

263

264

Figura 3. Cromatograma do óleo essencial de orégano, evidenciando os compostos β -terpinene (pico 3), β -pinene (pico 4), (+)-4-carene (pico 6), o-cymol (pico 7), (+)-sylvestrene (pico 8), γ -terpinene (pico 11), 2-carene (pico 13), 5-isopropyl-2-methylbicyclo [3.1.0] hexan-2-ol (pico 14), 4-terpineol (pico 17), α -terpineol (pico 18), Thymolmethylester (pico 21), Hidroxy-p-cymene (pico 24), β -caryophyllene (pico 29), γ -elemene (pico 31), Methylpalmitate (pico 35).

Os constituintes 1-8 cineol, 4-terpineol e α -terpineno têm sido descritos como responsáveis pela ação antimicrobiana da família Lamiaceae (Lambert *et al.*, 2001).

265 Desta forma, provavelmente estas altas concentrações contribuíram para os resultados
266 de CIM e CBM frente às bactérias estudadas. Além disso, é possível que núcleos
267 aromáticos, contendo um grupo polar, possam fazer ligações de hidrogênio com os
268 sítios ativos de enzimas microbianas, favorecendo esta atividade (Lambert et al., 2001).
269 Apesar de na análise dos óleos, os compostos fenóis monoterpênicos timol e carvacrol
270 não terem sido majoritários, é citado na literatura que estes apresentam excelente
271 atividade antimicrobiana, podendo desorganizar as proteínas constituintes de
272 membranas celulares e inibir a respiração celular (Romero et al., 2012). Souza (2010)
273 sugere que os óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. majorana* atuem como inibidores da
274 parede celular.

275 Diferentes mecanismos estão envolvidos na ação dos óleos essenciais sobre os
276 microrganismos. As inibições mais frequentes envolvem componentes fenólicos, que
277 sensibilizam a bicamada lipídica da membrana celular e alteram a atividade dos canais
278 de cálcio, causando aumento da permeabilidade e liberação dos constituintes
279 intracelulares vitais (Ribeiro, 2011). Grupos hidroxilas fenólicos também podem causar
280 danos ao sistema enzimático do microrganismo envolvido na produção de energia e na
281 síntese de componentes estruturais, bem como a destruição ou inativação de material
282 genético (Porto & Godoy, 2001; Ribeiro, 2011).

283 No teste de microdiluição em caldo frente aos isolados bacterianos, utilizando o
284 extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata*, nas concentrações de 100 a 0,195 mg/mL,
285 não observou-se atividade inibitória. Sendo que apenas as cepas de *Staphylococcus*
286 *aureus* e *Streptococcus agalactiae* e dois isolados, *Enterococcus faecalis* e
287 *Staphylococcus intermedius*, apresentaram CIM de 100 mg/mL e um isolado de
288 *Staphylococcus aureus* apresentou CIM de 50 mg/mL. Estes resultados podem ter
289 relação com a concentração de princípios ativos encontrados nas folhas de *Bauhinia*
290 *forficata*, que pode variar de acordo com a estação do ano, temperatura, luz solar, solo,
291 parte vegetal, desenvolvimento da planta, método de extração e concentração estudada
292 (Seixas, 2012; Giordani, 2013).

293 As particularidades dos extratos vegetais em geral podem ser alteradas por
294 variações genéticas intraespecíficas, bem como por fatores climáticos, solo, época e
295 forma de plantio, adubação, material da planta (fresco ou seco), técnica de extração,

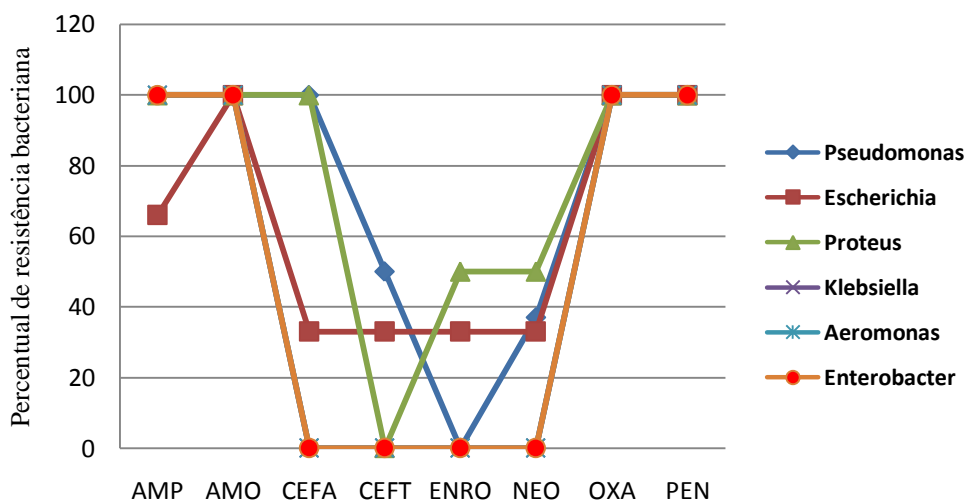
296 fonte botânica, colheita dentre outros podendo influenciar na atividade antimicrobiana
297 (Lambert et al., 2001).

298 Nos testes de sensibilidade frente aos antibióticos, em geral houve maior
299 resistência frente aos antibióticos β -lactâmicos, sendo aproximadamente 100% das
300 bactérias Gram negativas resistentes à Ampicilina, Amoxicilina, Oxacilina e Penicilina
301 G, com apenas um isolado de *E. coli* sensível a ampicilina. Em relação aos outros
302 antibióticos, os microrganismos Gram negativos em geral, apresentaram 95%, 80%,
303 30%, 25%, e 20% de resistência para ampicilina, cefalexina, neomicina, ceftriaxonae
304 enrofoxacina, respectivamente.

305 Quanto à resistência dos gêneros e espécies frente aos antibióticos, o gênero
306 *Pseudomonas* apresentou 100% de resistência a Ampicilina, Amoxicilina, Cefalexina,
307 Oxacilina e Penicilina, e frente à Ceftriaxona e Neomicina apresentou 50% e 37%
308 respectivamente, sendo 100% sensível a enrofloxacina. O gênero *Proteus* apresentou
309 100% de resistência a Ampicilina, Amoxicilina, Cefalexina, Oxacilina e Penicilina,
310 sendo 50% dos isolados deste gênero sensível a Enrofloxacina e Neomicina e
311 100% sensível a Ceftriaxona.

312 Os gêneros *Klebsiella*, *Aeromonas* e *Enterobacter* foram 100% resistentes a
313 Ampicilina, Amoxicilina, Oxacilina e Penicilina, apresentando 100% de sensibilidade
314 frente Cefalexina, Ceftriaxona, Enrofloxacina e Neomicina, exceto o gênero
315 *Enterobacter* que apresentou 33% de resistência frente a enrofloxacina. A espécie *E.*
316 *coli* foi 100% resistente a Amoxicilina, Oxacilina e Penicilina, apresentando 66% de
317 resistência frente Ampicilina e 33% frente a Cefalexina, Ceftriaxona, Enrofloxacina e
318 Neomicina (Fig. 4).

319 Em relação às cepas utilizadas (ATCC), o exemplar de *Klebsiella pneumoniae*
320 apresentou 100% de resistência frente a todos antibióticos, já o gênero *Enterobacter*
321 apresentou 100% de resistência frente à Oxacilina e Penicilina G, 50% frente à
322 Ampicilina e Cefalexina, sendo sensível aos outros antibióticos. O gênero *Proteus*
323 apresentou resistência somente frente à Oxacilina (100%) e frente à Ampicilina (50%).
324 O exemplar de *Aeromonas hydrophila* foi sensível somente à Enrofloxacina e
325 Neomicina, já o exemplar de *Escherichia coli* foi sensível a Ampicilina, Cefalexina,
326 Ceftriaxona, Enrofloxacina e Neomicina.



327

328

329

330

331

332

333

Figura 4. Percentual de resistência de bactérias Gram negativas isoladas de lesões cutâneas de cães frente aos antibióticos Ampicilina (AMP), Amoxicilina (AMO), Cefalexina (CEFA), Ceftriaxona (CEFT), Enrofloxacina (ENRO), Neomicina (NEO), Oxacilina (OXA), Penicilina G (PEN).

334

335

336

337

338

339

Ampicilina, amoxicilina e penicilina G são fármacos muito utilizados na medicina veterinária, em especial para infecções causadas por bactérias Gram negativas, porém neste estudo esses antibióticos apresentaram baixo desempenho. Concordando com estudo de Cruz e colaboradores (2012), que citam um aumento drástico da resistência a estes antimicrobianos nos últimos anos em decorrência da ampla utilização na terapêutica, muitas vezes de forma inadequada.

340

341

342

343

344

As bactérias Gram negativas apresentaram alta porcentagem de resistência frente às cefalosporinas de primeira geração, que agiram em somente 20% dos isolados, porém a ceftriaxona, cefalosporina de terceira geração, apresentou grande desempenho frente aos Gram negativos, agindo sobre 75% dos isolados corroborando com dados obtidos por Cruz et al. (2012).

345

346

347

348

349

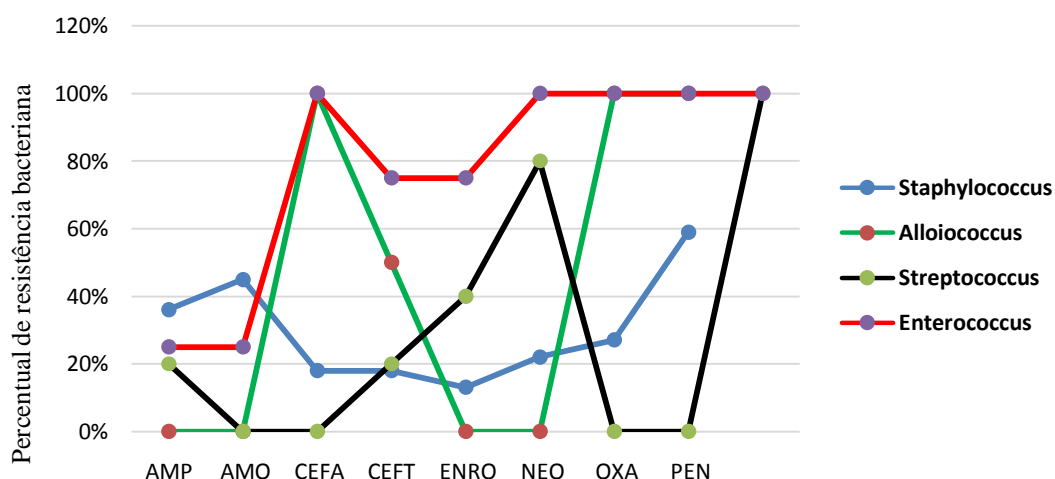
Todos os isolados do gênero *Pseudomonas* foram resistentes a 60 ou 80% dos antibióticos testados, fato que Mello (2014) explica ser decorrente da propriedade de transferência de genes de resistência que estas bactérias possuem.

Segundo Pessoa (2013), *Pseudomonas aeruginosa* possui mecanismos naturais e adquiridos de resistência que tornam difícil o manejo clínico do paciente infectado e

350 isso ocorre graças à baixa permeabilidade de sua membrana, à capacidade de formar
351 biofilme, de carrear plasmídeos e genes de resistência e aos mecanismos de resistência
352 adquirida, como a hiperexpressão de bombas de efluxo, a produção de β -lactamases e a
353 perda ou expressão reduzida de proteínas de membrana externa (Pessoa, 2013; Matos et
354 al., 2014).

355 Neste estudo, as bactérias Gram positivas apresentaram maior resistência frente
356 à penicilina G em 57% dos isolados. O antibiótico enrofloxacina foi o que mais
357 apresentou atividade *in vitro* frente a todas bactérias, com 26% de resistência dos
358 isolados Gram positivos. Os antibióticos que apresentaram menores índices de
359 resistência foram neomicina (46%), amoxicilina (42%), oxacilina (38%), ampicilina
360 (38%), cefalexina (30%) e ceftriaxona (30%).

361 Quanto à resistência dos gêneros frente aos antibióticos, o gênero
362 *Staphylococcus* apresentou 36%, 45%, 13%, 22%, 27%, 59% de resistência frente a
363 Ampicilina, Amoxicilina, Enrofloxacina, Neomicina, Oxacilina e Penicilina G,
364 respectivamente, apresentando 18% de resistência frente a Cefalexina e Ceftriaxona. O
365 gênero *Alloiococcus* apresentou 100% de resistência a Cefalexina, Oxacilina e
366 Penicilina, sendo 50% dos isolados sensível a Ceftriaxona e 100% sensível a
367 Amoxicilina, Ampicilina, Enrofloxacina e Neomicina. O gênero *Streptococcus*
368 apresentou 20% de resistência à Ampicilina e Ceftriaxona, 40% e 80% de resistência à
369 Enrofloxacina e Neomicina, respectivamente e 100% de sensibilidade frente à
370 Amoxicilina, Cefalexina, Oxacilina e Penicilina G. O gênero *Enterococcus* apresentou
371 25% de resistência frente à Ampicilina e Amoxicilina, 75% frente a Ceftriaxona e
372 Enrofloxacina e 100% de resistência frente a Cefalexina, Neomicina, Oxacilina e
373 PenicilinaG (Fig. 5).



374

375

376

377

378

379

Figura 5. Percentual de resistência de bactérias Gram positivas isoladas de lesões cutâneas de cães frente aos antibióticos Ampicilina (AMP), Amoxicilina (AMO), Cefalexina (CEFA), Ceftriaxona (CEFT), Enrofloxacina (ENRO), Neomicina (NEO), Oxacilina (OXA), Penicilina G (PEN).

380

381

382

383

384

385

386

Como resultado das ATCC's, o gênero *Staphylococcus* apresentou 100% de sensibilidade a todos os antibióticos, exceto à enrofloxacina, apresentando 33% de resistência. A espécie *Streptococcus agalactiae* apresentou resistência somente à Neomicina. Já o gênero *Enterococcus* apresentou-se com alta resistência, sendo 100% resistente frente à Cefalexina, Ceftriaxona, Neomicina e Oxacilina e com resistência de 50% frente à Ampicilina, Amoxicilina e Penicilina, já em relação ao antibiótico enrofloxacina, este gênero apresentou-se 100% sensível.

387

388

389

390

391

392

393

394

395

396

Segundo May (2006), citado por Ishii et al. (2011), antimicrobianos da classe das fluoroquinolonas constituem boas escolhas no tratamento de piodermites. Pedersen et al. (2007), citado por Ishii et al. (2011), obtiveram somente 1,2% de resistência à enrofloxacina em 84 amostras de *Staphylococcus* spp. avaliadas, entretanto, Proietti et al. (2012) detectaram resistência à enrofloxacina em 94,3% dos isolados. Em estudo realizado por Onuma et al. (2011), citado por Ishii et al. (2011), todos os isolados de cães com pioderma foram suscetíveis às fluoroquinolonas no primeiro período avaliado, sendo na década seguinte, 50% das cepas analisadas resistentes a tais fármacos, fato que vem ocorrendo devido à resistência progressiva a essa classe de antibióticos, por mutação e atualmente mediada por plasmídeos, o que se acreditava

397 que não ocorresse nesta classe de antibióticos. Além disto, Silva et al. (2014) citam o
398 aumento de resistência frente às fluorquinolonas devido a utilização frequente e
399 indiscriminada na terapia de dermatopatias e outras infecções, principalmente da
400 enrofloxacin, a qual, no Brasil, é facilmente adquirida em estabelecimentos
401 veterinários, sem necessidade de receituário.

402 De acordo com Ishii et al. (2011), as taxas de resistência antimicrobiana em
403 animais de companhia se elevaram ao longo dos anos, pois cada vez mais os pacientes
404 são tratados com antibióticos de amplo espectro sem a certeza da sua real necessidade,
405 já que exames para a identificação e sensibilidade bacteriana muitas vezes não são
406 realizados, além da facilidade de compra, em que não há controle do antibiótico
407 vendido. Segundo Oliveira (2004), cerca de 25 a 50% de todas as prescrições de
408 antibióticos são inadequadas devido à escolha incorreta do medicamento ou à dose e
409 duração do tratamento.

410 O aumento das resistências afeta a eficácia do tratamento com o antibiótico,
411 trazendo consequências a nível clínico como aumento da mortalidade e morbidade,
412 assim como consequências econômicas como o aumento dos custos de hospitalização e
413 terapêutica (French, 2005).

414

415 **CONCLUSÃO**

416 Os óleos essenciais da família Lamiaceae apresentam atividade antibacteriana
417 frente aos isolados provenientes de lesões cutâneas *in vitro*. No entanto, o extrato
418 hidroalcoólico de *Bauhinia forficata*, não apresentou atividade nas concentrações
419 testadas frente a maioria dos isolados. Os óleos da família Lamiaceae são promissores
420 como alternativa em casos de resistência bacteriana, porém são necessários mais
421 estudos, principalmente em relação a testes de toxicidade *in vitro*, para posteriores
422 testes de eficiência e toxicidade *in vivo*.

423

424 **AGRADECIMENTOS**

425 A professora Raquel Lüdtke pela realização da identificação botânica. Ao professor
426 Rogério Freitag pela realização das análises químicas dos óleos. Ao Programa de Pós-
427 Graduação em Veterinária-UFPel, e aos órgãos financiadores CNPq, CAPES e
428 FAPERGS.

429 **REFERÊNCIAS**

430

431 ARIAS, M.V.B.; BATTAGLIA, L.A.; AIELLO, G. et al. Identificação da
432 suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de cães e gatos com feridas
433 traumáticas contaminadas e infectadas. *Semina*, v.29, n.4, p.861-874, 2008.

434 ARIAS, M.V.B.; CARRILHO, C.M.D.M. Resistência antimicrobiana nos animais e no
435 ser humano. Há motivo para preocupação? *Semina*, v.33, n.2, p.775-790, 2012.

436 BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.; SHERRIS, J.C.; TURCK, M. Antibiotic susceptibility
437 testing by a standardized single disk method. *Am. J.Clin.Pathol.*,v.36, p.493-496, 1966.

438 BUSATTA, C. *Caracterização química e atividade antimicrobiana in vitro e em*
439 *alimentos dos extratos de orégano e manjerona*. 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em
440 Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade
441 Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim.

442 CLEFF, MARLETE BRUM. *Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de*
443 *Origanum vulgare L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em*
444 *Candida spp.* 2008. 129f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de
445 Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

446 CRUZ, A.R.; PAES, A.C.; SIQUEIRA, A.K. Perfil de sensibilidade de bactérias
447 patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. *Vet. e Zootec.*, v.19, n.4, p.601-
448 610, 2012.

449 FRENCH, G.L. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. *Adv.*
450 *Drug.Deliver. Rev.*, v.57, n.10, 1514-1527, 2005.

451 GIORDANI, C. *Investigação de plantas medicinais e tóxicas em Pelotas-RS e*
452 *determinação da atividade antifúngica frente a Malasseziapachydermatis*. 2013. 26f.
453 Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária)- Faculdade de Veterinária,
454 Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

455 HUSSAIN, A.I.; ANWAR, F.; CHATHA, S.A.S. et al. *Rosmarinusofficinalis* essential
456 oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Braz. J. Microbiol.*, v.41,
457 n.4, p.1070-1078, 2010.

- 458 ISHII, J.B.; FREITAS, J.C.; ARIAS, M.V.B. Resistência de bactérias isoladas de cães e
459 gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009).
460 *Pesq. Vet. Bras.*v.31, n.6, p.533-537, 2011.
- 461 LAMBERT, R.J.W.; SKANDAMIS, P.N.; COOTE, P.J.A Study of the minimum
462 inhibitory concentration and mode of action of oregano essencial oil, thymol and
463 carvacrol.*J Appl.Microbiol.*, v.91, p.453-462, 2001.
- 464 LIMA, C.O; BARRETO, H.M.; LIMA, E.O. et al. Antimicrobial effect of the essential
465 oil from *Rosmarinus officinalis* L. against *Staphylococcus pseudointermedius* isolated
466 from dogs.*R. bras. Bioci.*, v.11, n.3, p. 280-283, 2013.
- 467 MATOS, E.O.; MODESTO, N.S.; COSTA, W.L.O. et al. Prevalência de agentes
468 microbianos e sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev. Para. Med.*, v.28, n.2,
469 p.35-43, 2014.
- 470 MELLO, M.R.S. *Detecção da atividade da enzima carbapenemase em*
471 *Enterobacteriaceae e Pseudomonas aeruginosa isoladas em clínicas veterinárias do*
472 *Distrito Federal, Brasil.* 2014. 38 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) -
473 Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília.
- 474 CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow
475 Aerobically; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M7-A8. Wayne,
476 PA: Clinical and LaboratoryStandards Institute, 2009.
- 477 OLIVEIRA, A.C.; CIOSAK, S.I. Infecção de sítio cirúrgico no seguimento pós-alta:
478 impacto na incidência e avaliação dos métodos utilizados. *Rev. Escola Enfermagem*
479 *USP*, v.38, n.4, p.379-385, 2004.
- 480 PESSOA, V.S. *Pseudomonas aeruginosa: epidemiologia e resistência a*
481 *antimicrobianos em hospital universitário do sudeste do Brasil.* 2013. 49f. Dissertação
482 (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de
483 Uberlândia, Uberlândia.
- 484 PORTE, A.; GODOY, R.L.O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades
485 antimicrobiana e química do óleo essencial. *B. CEPPA*, v.19, n.2, p.193-210, 2001.

- 486 POZZO, M.D.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D.F. Atividade antimicrobiana de óleos
487 essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina.
488 *Cienc. Rural*, v., n.4, p.667-672, 2011.
- 489 RIBEIRO, D. S. *Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim*
490 *(Rosmarinus officinalis L.) frente a bactérias isoladas de alimentos: estudos in vitro e*
491 *em matriz alimentícia*. 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) -
492 Faculdade de Farmácia, Universidade federal da Bahia, Salvador.
- 493 ROMERO, A. L.; ROMERO, R.B.; SILVA, E.L.et al. Composição química e atividade
494 do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. *Rev. Unopar*
495 *Cient. Cienc. Biol. Saúde*, v. 14, n. 4, p.231-235, 2012.
- 496 SANTURIO, D. F.; COSTA, M. M.; MABONI, G. et al. Atividade antimicrobiana de
497 óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves
498 e bovinos. *Cienc. Rural*, v.41, n.6, p.1051-1056, 2011.
- 499 SCHIEDECK, G.; BEVILAQUA, G.A.P.; NACHTIGAL, G.F.; BAUER, M.V.L.
500 Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. *Comunicado*
501 *técnico-EMBRAPA- Pelotas*, n.190, p.1-4, 2008.
- 502 SCOTT, D.W., MILLER, D. H.; GRIFFIN, C. E. 2001. Muller and Kirk's Small
503 Animal Dermatology.6.ed. Philadelphia: Saunders. 1528p.
- 504 SALAZAR, A.S.L.M.O. *Estudo da resistência às cefalosporinas de terceira geração*
505 *de isolados de Escherichia coli de origem canina*.2011. 81f. Dissertação (Mestrado
506 Integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária,
507 Universidade Técnica de Lisboa, Lisboa.
- 508 SEIXAS, P. *Efeito da adubação mineral na produção de biomassa, teor e composição*
509 *do óleo essencial e fungitoxicidade in vitro do capim-citronela*. 2012, 89f. Dissertação
510 (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi.
- 511 SILVA, M.G.F. *Atividade antioxidante e antimicrobiana in vitro de óleos essenciais e*
512 *extratos hidroalcolólicos de manjerona (Origanum majorana L.) e manjeriço*
513 *(Ocimum basilicumL.)*. 2011. 70f. Graduação (Bacharelado em Química) – Faculdade
514 de Química, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco.

- 515 SILVA, A.; SCHMIDT, C.; VARGAS, A.C. et al. Suscetibilidade antimicrobiana de
516 *Staphylococcus* spp. isolados de cães com pioderma superficial. *Pesq. Vet. Bras.*, v.34,
517 n.4, p.355-61, 2014.
- 518 SOUZA, N.A.B. *Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais*
519 *contra fungos patogênicos*. 2010. 150f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e
520 Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa.

4.2 Artigo 2

**Avaliação *in vitro* do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata*
frente ao *Sporothrix brasiliensis***

**Karina Affeldt Guterres, Claudia Giordani, Caroline Bohnen de
Matos, Cristine Cioato da Silva, Mário Meireles, Marlete Brum Cleff
Será submetido à revista Archives of Veterinary Science**

AVALIAÇÃO DO EXTRATO HIDROALCOÓLICO DE *BAUHINIA FORFICATA* FRENTE AO *SPOROTHRIX BRASILIENSIS*

RESUMO: Esporotricose é uma micose subcutânea que afeta humanos e animais, sendo causada por fungos do complexo *Sporothrix*, incluindo a espécie *S. brasiliensis*. O itraconazol é considerado o fármaco de primeira escolha para o tratamento, porém algumas espécies fúngicas têm demonstrado maior resistência a este antifúngico. Neste contexto, tem se buscado novos tratamentos, destacando-se pesquisas com plantas medicinais. Dessa forma, objetivou-se avaliar a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* frente a isolados de *Sporothrix brasiliensis*. A técnica de microdiluição em caldo foi utilizada para avaliar sensibilidade de sete isolados fúngicos (n=1 canino e n=6 felinos) frente a dez concentrações do extrato (100 a 0,19mg/mL), utilizando-se como controle positivo itraconazol (0,5-64 µg/ml). Nas concentrações estudadas foi evidenciada CIM de 100 mg/mL do extrato hidroalcoólico de *B. forficata* frente ao *S. brasiliensis*, porém os valores de CFM foram superiores a 100 mg/mL para todos isolados. Em relação ao itraconazol, cinco dos isolados (71,4%) apresentaram CFM de 64 µg/ml. Maiores estudos acerca da atividade da planta, utilizando outras formas de extratos, diferentes concentrações e outras partes vegetais devem ser realizados, visto que esta apresenta atividade frente a outros microrganismos, incluindo fungos, podendo vir a ser um bom alvo para estudo no tratamento da esporotricose.

Palavras-chave: complexo *Sporothrix*; plantas medicinais; pequenos animais; resistência.

**EXTRACT ASSESSMENT HYDROALCOHOLIC *BAUHINIA FORFICATA* FRONT
*SPOROTHRIX BRASILIENSIS***

ABSTRACT: Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis affecting humans and animals and is caused by *Sporothrix* complex of fungi, including species *S. brasiliensis*. Itraconazole is considered the drug of choice for treatment, but some fungal species have shown greater resistance to this antifungal. In this context, has sought new treatments, especially research on medicinal plants. This work aimed to evaluate the antifungal activity of hydroalcoholic extract of *Bauhinia forficata* against isolates of *Sporothrix brasiliensis*. The broth microdilution technique was used to evaluate sensitivity seven fungal isolates (n = 1 canine and n = 6 feline) against ten extract concentrations (100 to 0,19 mg/mL), using as a positive control itraconazole (0,5 - 64 mg/mL). The concentrations studied was observed MIC of 100 mg / mL of alcoholic extract of *B. forficata* against *S. brasiliensis*, but the CFM values were greater than 100 mg / mL for all isolates. Regarding itraconazole, five isolates (71,4 %) showed 64 CFM/mL. Further studies on the plant activity using other forms of extracts, different concentrations and other plant parts must be carried out, as it has activity against other microorganisms, including fungi and could be a good target for study in the treatment of sporotrichosis.

Key words: *Sporothrix* complex; medicinal plants; small animals; resistance

INTRODUÇÃO

Esporotricose é uma micose subcutânea grave que afeta humanos e animais (MONTEIRO et al., 2008), sendo considerada a principal micose subcutânea em felinos e caninos (SOUZA et al., 2009), podendo evoluir para uma doença sistêmica e ao óbito, quando acomete animais imunossuprimidos (MARIMON et al., 2007).

Durante muito tempo, apenas uma espécie era considerada patogênica dentro do gênero *Sporothrix*, identificada como *Sporothrix schenckii* (SOUZA et al., 2009). No entanto, recentemente, com base em estudos genômicos, sequenciamento de DNA, morfologia, fisiologia e nutrição, *S. schenckii* foi considerado como um complexo, que inclui seis espécies diferentes, havendo dentre estas, a espécie *S. brasiliensis*, encontrada no Brasil e considerada altamente patogênica (MARIMON et al., 2007). De acordo com Rodrigues e colaboradores (2013), o *Sporothrix brasiliensis* vem sendo diagnosticado em 96% dos casos de esporotricose felina no Brasil, e conseqüentemente humana devido ao potencial de transmissão zoonótica.

O itraconazol é considerado o fármaco de primeira escolha para o tratamento das formas cutânea e linfocutânea de esporotricose em animais, porém algumas espécies fúngicas têm demonstrado maior resistência a este antifúngico (SCHUBACH et al., 2004). Além disso, tem sido reportada a perpetuação da enfermidade, especialmente em felinos domésticos, principalmente devido ao longo tempo de tratamento e abandono da terapia, associada às falhas terapêuticas por conta de resistência, o que traz grande preocupação à área médica (GIORDANI, 2013; LAVADOURO et al., 2013).

Neste contexto, tem se buscado novas alternativas ao tratamento convencional, destacando-se os estudos no âmbito das plantas medicinais, sob diversas formas de extrato (CLEFF, 2008). Dentre as plantas de interesse, destacam-se as da família Fabaceae, como a *Bauhinia forficata*, devido a demonstrar atividade antibacteriana, cicatrizante, hipoglicemiante, antidiarreica, antiviral, analgésica, anti-tumoral e antifúngica (MENEZES et al., 2007).

Dessa forma, o presente estudo objetivou avaliar a atividade antifúngica do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* frente a isolados clínicos de *Sporothrix brasiliensis* proveniente de animais.

MATERIAL E MÉTODOS

A planta utilizada no estudo foi coletada no distrito do Povo Novo, Rio Grande - RS, sendo encaminhada para identificação no Setor de Botânica – UFPel e após seca em estufa com circulação de ar sob temperatura de 35°C.

Para o preparo do extrato vegetal foi utilizada a técnica descrita por Schiedeck et al. (2008), onde as folhas foram pesadas e adicionadas de álcool de cereais 70%. Durante sete dias esta mistura permaneceu em frasco de vidro estéril hermeticamente fechado, protegido da luz e em temperatura ambiente, sendo agitada manualmente uma vez ao dia. Após este período, a amostra foi filtrada com gaze estéril, sendo o volume restituído com álcool de cereais 70%, resultando em tintura, que permaneceu em frasco âmbar estéril hermeticamente fechado até o uso. No momento do uso do extrato, foi utilizado o rotaevaporador à vácuo, com banho de aquecimento a 40°C para retirada do álcool de cereais, restituindo-se o volume com H₂O destilada estéril, resultando em um extrato hidroalcoólico. O extrato foi testado em dez concentrações seriadas de 100 a 0,19mg/mL em duplicata. O antifúngico itraconazol foi testado também como método comparativo e de identificação de resistência dos isolados, nas concentrações de 0,5 - 64 µg / mL.

Foram utilizados sete isolados de *S. brasiliensis* em sua forma filamentosa através do cultivo em meio Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol a 25°, 7 dias. Os isolados foram estocados no Laboratório de Micologia Veterinária – UFPel até utilização e eram provenientes de casos clínicos de felinos (n=6) e canino (n=1),

sendo que o isolado canino era de paciente com dermatopatia bacteriana associada, resistente a todos os antibióticos testados.

A atividade antifúngica foi avaliada em duplicata pela técnica de microdiluição em caldo (CLSI M38-A2, 2008) com modificações para fitofármacos e *S. brasiliensis*. O inóculo foi preparado a partir de colônias fúngicas com sete dias de crescimento em meio Sabouraud Dextrose com Cloranfenicol, onde adicionou-se solução salina e após diluições, padronizou-se com espectrofotômetro (comprimento de onda de 530nm e transmitância de 70-76%) (MADRID et al., 2013). Os resultados foram expressos em Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM), por leituras visuais do crescimento das colônias ou turvação do meio, após um período de 72 horas em estufa a 25°C. Para determinação da CFM, foram semeados 10µL das suspensões das microplacas em ágar Sabouraud dextrose com cloranfenicol incubadas a 25°C por sete dias.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A identificação botânica resultou em *Bauhinia forficata candicans*, com número de registro 25933/Herbário Pel, Botânica- UFPel.

No teste *in vitro*, foi evidenciada atividade inibitória do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* frente aos isolados de *Sporothrix brasiliensis*, na maior concentração testada (100mg/mL), não havendo CFM (>100mg/mL) enquanto que o itraconazol apresentou CIM e CFM entre 8 e $\geq 64\mu\text{g/ml}$ (Tabela 1).

Tabela 01. Resultados do teste de microdiluição em caldo (CIM e CFM) avaliando a atividade do extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* e do antifúngico padrão itraconazol frente a isolados de *Sporothrix brasiliensis*.

Isolado	Extrato (mg/mL)		Antifúngico padrão (µg/mL)	
	<i>Bauhinia forficata</i>		Itraconazol	
	CIM	CFM	CIM	CFM
1	100	>100	64	64
2	100	>100	8	>64
3	100	>100	>64	>64
4	100	>100	0,5	64
5	100	>100	64	64
6	100	>100	16	64
7**	100	>100	64	64

*Valores de >100 correspondem a concentração sem atividade fungicida.

**Isolado canino.

O complexo *Sporothrix* vem sendo estudado quanto a diferenças de patogenicidade e sensibilidade (OLIVEIRA et al. 2011), sendo que algumas espécies tem demonstrado maior resistência ao itraconazol, antifúngico de escolha para o tratamento da esporotricose em veterinária (SCHUBACH et al., 2004). A ocorrência de microrganismos resistentes aos antimicrobianos rotineiramente utilizados, bem como às recidivas em casos clínicos, efeitos tóxicos e o número limitado dos antifúngicos disponíveis têm impulsionado a pesquisa utilizando as plantas, como a *Bauhinia forficata*, com a finalidade de descobrir novos princípios ativos para tratamento das enfermidades (MENEZES et al., 2009; GIORDANI, 2013).

O potencial antifúngico de *Bauhinia forficata* vem sendo estudado, tendo apresentado atividade na forma de extrato de acetato de etila dos caules frente a *Epidermophyton floccosum*, (CIM= 750 µg/mL), assim como dos extratos de hexano das cascas, o qual foi ativo frente *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *E. floccosum* com CIM<1000mg/ml para todas as espécies fúngicas estudadas (SILVA E FILHO, 2002). O extrato de

diclorometano das cascas apresentou ação antifúngica contra *T.rubrum* e *E. floccosum* com CIM de 500 µg/mL (SILVA E FILHO, 2002).

Apesar de a planta *Bauhinia forficata* apresentar atividade frente a microorganismos variados, não há estudos da sua atividade frente ao complexo *Sporothrix*, mais especificamente frente ao *S. brasiliensis*, sob nenhuma forma de extrato ou parte da planta, sendo este trabalho o primeiro com este enfoque. Tratando-se do complexo *Sporothrix*, Ratslaff (2013) estudou a utilização das plantas *Schinus terebinthifolius*, *Baccharis trimera* e *Solidago chilensis*, em testes de microdiluição em caldo, nos quais se obteve resultados satisfatórios, sendo a maior CFM de *Schinus terebinthifolius* nos isolados testados de 25mg/mL. Já D'Ávila (2013), com a utilização de plantas da família Lamiaceae na forma de óleos essenciais frente ao *S. schenckii*, demonstrou efetividade de *Rosmarinus officinalis* com CIM de $\leq 0,06$ a 1 mg/ml e CFM de $\leq 0,06$ mg/mL a 4,3 mg/ml nos isolados.

Os resultados obtidos no teste *in vitro* utilizando o antifúngico padrão itraconazol (CIM= 0,5 a $>64\mu\text{g/mL}$ e CFM $\geq 64\mu\text{g/mL}$) evidenciaram 57% de resistência (n=4/7) nos isolados estudados, considerando que 4 isolados tiveram CIM= $64\mu\text{g/mL}$ e todos tiveram CFM $\geq 64\mu\text{g/mL}$. D'Ávila (2013) cita a variação da CFM de itraconazol em seus testes de 4 a $>16\mu\text{g/mL}$ e a variação de CIM de 0.25 a $>16\mu\text{g/mL}$, valores consideravelmente inferiores aos encontrados no presente experimento. Apesar dos testes não serem específicos para o complexo *Sporothrix*, resultados do itraconazol com CIM $\geq 4,0\mu\text{g/mL}$ são tidos como resistentes para alguns fungos filamentosos (CLSI M38-A2, 2008).

Em um estudo realizado por Oliveira e colaboradores (2011), a espécie *S. brasiliensis* foi a que apresentou os menores resultados de Concentração Inibitória Mínima (CIM) quando utilizado o antifúngico Itraconazol, não concordando com os

resultados obtidos neste estudo, ressaltando desta forma a alta resistência destes isolados.

Neste ensaio, o extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* apresentou efeito inibitório para *S. brasiliensis*, com CIM de 100mg/mL, sendo uma possível alternativa de tratamento deste patógeno. Além disto, estudos prévios demonstraram eficácia deste extrato na cicatrização de feridas de animais de companhia (ACOSTA et al., 2012), o que estimula a busca pelo entendimento dos mecanismos de ação desta planta. Maiores estudos acerca da atividade da planta, utilizando outras formas de extratos, concentrações e outras partes vegetais devem ser realizados, visto a atividade demonstrada frente a diversos fungos e bactérias.

CONCLUSÕES

Os resultados demonstraram que o extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* em concentrações até 100mg/ml, não apresentou atividade fungicida *in vitro* frente ao *S. brasiliensis*, porém apresentou atividade fungistática, com CIM de 100 mg/mL.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, G. S.; GIORDANI, C.; MATOS, C. B.; BATISTA, M.; GUTERRES, K. A.; SILVA, C. C.; LADEIRA, S.; MEINERZ, A. R. M.; FERREIRA, C. M.; CLEFF, M. B. **Determinação da atividade da infusão de *Bauhinia forficata* no tratamento de ferida aberta de cão.** In: SIMPÓSIO IBEROAMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS, VI., 2012, Ponta Grossa. **Anais do VI Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais**, Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2012.
- CLEFF, MARLETE BRUM. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida* spp.** 2008. Porto Alegre, 129f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE - CLSI. **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts: proposed standard.** M38-A2, 2008.

- D'AVILA, C.A.; WALLER, S.B.; MADRID, I.M. et al. Atividade *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* frente a cepas do complexo *Sporothrix* sp. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, XXII., 2013. **Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2013.
- GIORDANI, C. **Investigação de plantas medicinais e tóxicas em Pelotas-RS e determinação da atividade antifúngica frente a *Malassezia pachydermatis***. 2013. Pelotas, 126f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária)-Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas.
- LAVADOURO, J.B.; MATOS, C.B.; LOPES, D.J. et al. Dificuldades terapêuticas no tratamento da esporotricose felina. In: Mostra de Produção Universitária da Universidade Federal de Rio Grande, 12., 2013. **Anais da 12ª Mostra de Produção Universitária da Universidade Federal de Rio Grande**, Rio Grande: Universidade Federal de Rio Grande, 2013.
- MADRID, I. M.; TELES, A. J.; SANTIN, R. et al. Eficácia de soluções desinfetantes na eliminação de fungos de importância médica e veterinária. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n.1, p.65 – 70, 2013.
- MARTINS, A.A. **Esporotricose sistêmica experimental: Avaliação *in vivo* da β -(1–3) glucana e em associação ao itraconazol em modelo murino**. 2012. Porto Alegre, 119f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- MARIMON, R.; CANO, J.; GENE, J. et al. *Sporothrix brasiliensis*, *S. globosa* and *S. mexicana* three new *Sporothrix* species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v.45 n.10, p.3198–3206, 2007.
- MENEZES, F.S.; MINTO, A.B.M.; RUELA, H.S. et al. Hypoglycemic activity of two Brazilian Bauhinia species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.1, p.8-13, 2007.
- MENEZES, T.O.A.; ALVES, A.C.B.A.; VIEIRA, J.M.S. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.38, n.3, p.184-191, 2009.
- MONTEIRO, H.R.B.; TANENO, J.C.; NEVES, M.F. Esporotricose em felinos domésticos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.6, n.10, 2008.
- OLIVEIRA, D.C.; LOPES, P.G.M.; SPADER, T.B. et al. Antifungal Susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. Luriei* of the *S. Schenckii* Complex Identified in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v.49, n.8, p.3047-3049, 2011.
- RATSLAFF, K.; GIORDANI, C.; ALVES, G.A. et al. Ação dos extratos hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius*, *Baccharis trimera* e *Solidago chilensis* em *Sporothrix schenckii*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, XXII., 2013, Pelotas. **Anais do XII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2013.
- RODRIGUES, A.M.; TEIXEIRA, M.M.; HOOG, G.S. et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.7, n.6, p.1-14, 2013.
- SCHIEDECK, G.; BEVILAQUA, G.A.P.; NACHTIGAL, G.F. et al. Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. Comunicado técnico-EMBRAPA, Pelotas, n.190, p.1-4, 2008.

- SCHUBACH, T.M.; SCHUBACH, A.O.; OKAMOTO, T. et al. Utilidade do coágulo sanguíneo para o isolamento de *Sporothrix schenckii* de gatos naturalmente infectados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.404-408, 2004.
- SILVA, A.C.; SALES, N.L.P.; ARAÚJO, A.V. et al. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. **Ciências e Agrotecnologia**, v.33, n.spe, p.1853-1860, 2009.
- SILVA, K. L.; FILHO, V. C. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v.25, n.3, p.449-454, 2002.
- SOUZA, N.T.; NASCIMENTO, A.C.B.M.; SOUZA, J.O.T. et al. Esporotricose canina: relato de Caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, n.3, p.572-576, 2009.
- SOUZA, R.S.S.; SANTOS, D.R.; BELLA CRUZ, R.C.; VI Seminário Integrado de Iniciação Científica, Camboriú, Brasil, 2000.

4.3 Artigo 3

The Use of (1–3) β -Glucan Along with Itraconazole Against Canine Refractory Sporotrichosis

Utilização de (1-3) β -glucana em esporotricose canina causada por *Sporothrix brasiliensis* refratária ao Itraconazol

Karina Affeldt Guterres, Caroline Bohnen de Matos, Luiza Da Gama Osório, Isabel Duarte Schuch, Marlete Brum Cleff

Artigo Publicado na Revista Mycopathologia, v.177, p.217-221, 2014.

The Use of (1–3) β -Glucan Along with Itraconazole Against Canine Refractory Sporotrichosis

Karina Affeldt Guterres · Caroline Bohnen de Matos ·
Luiza Da Gama Osório · Isabel Duarte Schuch ·
Marlete Brum Cleff

Received: 19 July 2013 / Accepted: 21 February 2014 / Published online: 21 March 2014
Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

Abstract Sporotrichosis, caused by the *Sporothrix schenckii* fungal complex, is a zoonotic mycosis distributed worldwide. Itraconazole is the treatment of choice for domestic animals although some fungal isolates have shown resistance to this drug. The objective of this study was to report, for the first time, the use of (1–3) β -glucan along with itraconazole in the treatment of a canine with sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*. The animal had ulcerated and crusted lesions, especially on the nasal planum. Clinical samples were collected for a complete blood count, cytological analysis of the lesion, and fungal culture. Based on the results of the laboratory examination, and after the fungal culture, antibiotic therapy and treatment with itraconazole were initiated. Two additional fungal cultures were performed, which

were positive. After 7 months of the animal treatment with itraconazole, the *S. brasiliensis* culture was still positive, so that the itraconazole was associated with (1–3) β -glucan. After four weekly applications of glucan, the complete elimination of the fungus was observed based on the fungal culture negative results. The results show, therefore, that (1–3) β -glucan with itraconazole promoted the case resolution, and it may be considered a promising alternative for the treatment of sporotrichosis in cases of resistance to conventional therapy.

Keywords Antifungal Dog
Immunomodulators Subcutaneous mycosis

K. A. Guterres (✉) · C. B. de Matos
Mestranda em Clínicas Veterinária, Universidade Federal
de Pelotas, Capão do Leão, RS, Brazil
e-mail: guterres.karina@gmail.com

L. Da Gama Osório
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Av. Bento
Gonçalves, 9090, Agronomia, Porto Alegre, RS, Brazil

I. D. Schuch
Especialista em Clínica Médica de Pequenos Animais,
Capão do Leão, RS, Brazil

M. B. Cleff
Departamento de Clínicas Veterinária, Universidade
Federal de Pelotas, Capão do Leão/RS, Brazil

Introduction

Sporotrichosis is a subcutaneous mycosis that affects humans and animals [1], and it is considered the main subcutaneous mycosis in cats, but it is less frequent in canines [2]. In some Brazilian regions, however, it has been observed an increase in the number of cases in dogs and the cutaneous is the most prevalent form [3]. The infection is considered severe and may be fatal [4]. In dogs, the infection is mainly acquired through traumatic inoculation of materials colonized by the fungus, scratches, or bites during fights with cats [4].

For a long time, only one species was considered pathogenic within the genus *Sporothrix* [2], which is

identified as *Sporothrix schenckii*. However, recently, based on genetic studies, DNA sequencing, morphology, physiology, and nutrition, *S. schenckii* has been considered a complex that includes the species *S. schenckii*, *S. globosa*, *S. mexicana*, *S. luriae*, *S. albicans*, and *S. brasiliensis*, the latter found in Brazil and considered highly pathogenic [4, 5].

Currently, itraconazole is considered the first treatment choice for cutaneous and lymphocutaneous forms of sporotrichosis in small animals; however, in view of the therapeutic difficulties related to toxicity, resistance, therapeutic failures, and prolonged antifungal therapy, new alternatives for the disease treatment have been considered. One of them is the use of immunomodulators such as (1–3) β -glucan, which has great importance against pathogenic microorganisms via stimulation of the immune response [6].

Due to the severity of the disease and the difficulties encountered during the treatment, the aim of this study was to report the first case of canine sporotrichosis caused by *Sporothrix brasiliensis*, treated with the combination of (1–3) β -glucan and itraconazole.

Materials and Methods

The animal was found in the municipality of Cerrito, Rio Grande do Sul State, Brazil, with ulcerated lesions that were, some of them, crusty and pussy, distributed on the face, especially on the nasal planum, which was partially destroyed (Fig. 1). The patient was in poor body condition and had lesions that were free of ulcerations on the forelimbs, hindlimbs, and flank. In the physical examination, the heart and respiratory rates, capillary refill time, body temperature, and mucosal color were within normal parameters.

Laboratory tests such as complete blood count and cytological analysis of the lesions were requested. Considering the high number of sporotrichosis cases in southern Rio Grande do Sul State, fungal culture from nasal secretion and crusts were also requested, in order to rule out the disease.

For the realization of the fungal culture, secretion and crusts were collected from the nasal planum and sent to the Laboratory of Mycology, College of Veterinary (MICVET), UFPel. The clinical samples were duplicated and cultivated in Petri dishes containing Sabouraud dextrose with chloramphenicol and

cycloheximide. One plate was incubated at 37 °C for



Fig. 1 Patient upon arrival for clinical examination, showing destruction of the nasal planum with secondary contamination

the detection of yeast forms, while the other one was kept at 25 °C for the visualization of filamentous forms, during 48–72 h. Due to the destruction of the nasal planum, the clinical sample was also cultivated on Sabouraud with chloramphenicol, as a differential diagnosis of cryptococcosis.

Results and Discussion

The patient's complete blood count showed leukocytosis accompanied by a regenerative "left shift" and a discreet normocytic normochromic anemia. The cytological analysis showed a cell inflammatory pattern, what was inconclusive, as well as the yeast cultures, that showed only bacterial growth. Thus, an antibiotic therapy was initiated, with 30 mg kg⁻¹ of cephalexin, twice a day, for 30 days. Fifteen days after the beginning of the treatment with cephalexin, the animal presented a reduction in the lesions' secretion. New samples were then collected after rigorous cleaning of the nose planum with a 0.9 % saline solution and sent to the MICVET-UFPel for direct examination and

culture. The fungal culture was positive for sporotrichosis; at 25 °C, there was growth of a wrinkled colony, adhered to the culture medium, which was initially cream-colored, but became blackened over time. Under the optical microscope, fine septate hyphae and small dematiaceous conidia could be observed. The culture that was maintained at 37 °C resulted in colonies of a creamy consistency, and the microscopy analysis showed cells that were predominantly elongated, with some oval and rounded, characterizing the agent as *Sporothrix schenckii*. The macromorphology and micromorphology were similar to that previously described by many authors for *S. schenckii* [7, 8].

In addition to the antibiotic therapy, an antifungal therapy was also initiated with itraconazole at a concentration of 10 mg kg⁻¹, every 12 h. The patient showed a good response after 30 days of the antibiotic therapy, with normalization of the white blood cell (WBC) count, as well as reduction in pus from the lesions. Three months after beginning the therapy with itraconazole, the patient had the lesions healed; due to this fact, new fungal culture was requested, what was, again, positive. Two new collections were performed at 5–7 months after beginning the therapy, and all tests remained positive. Several studies performed *in vitro*, regarding antifungal susceptibility using clinical isolates of *S. schenckii*, have demonstrated a considerable diversity concerning susceptibility to different drugs, suggesting that these isolates may represent different species [4]. In addition, the fungus isolated in the last culture was sent to the Laboratory of Molecular Biology, at the Federal University of São Paulo. Further analysis using the polymerase chain reaction (PCR) resulted in the identification of an isolate of *Sporothrix brasiliensis*.

Sporotrichosis was assigned to only one species, *S. schenckii*. However, recent molecular studies have demonstrated that *S. schenckii* is a complex [4]. There are at least six phylogenetic species prevalent in different geographic regions [4], which are *S. albicans*, *S. inflata*, *S. luriei*, *S. brasiliensis*, *S. globosa*, and *S. mexicana* [9]. From the identified new species, *S. brasiliensis* is commonly found in South America, mainly in Brazil [5].

In view of the prolonged therapy, and because the canine sporotrichosis was refractory to the exclusive use of itraconazole, we established the therapy using the immunomodulator (1–3) β -glucan associated with antifungals. This association was initiated after eval-

uation of the complete blood count, as well as kidney

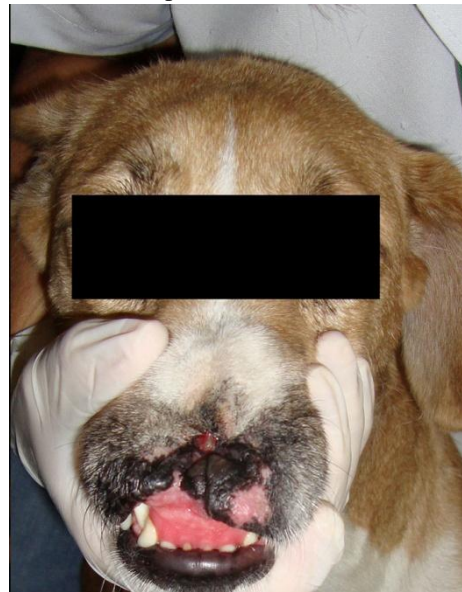


Fig. 2 Patient after the treatment with itraconazole along with (1–3) β -glucan

and liver functions, which were within normal parameters. We conducted a total of four glucan applications, with an interval of 7 days between each subcutaneous application, at a dose of 0.5 mg animal⁻¹. To our knowledge, there are no reports on the use of β -glucan in dogs. However, in an experimental study carried out by Martins [3], effective results were obtained from the use of this dose against ringworms. As a side effect derived from the use of (1–3) β -glucan, there was a formation of granuloma on the application areas, which reduced in few weeks. Such effects had also been observed in other studies by Martins [3].

A new blood test was performed to evaluate the patient after the use of (1–3) β -glucan. The results of the complete blood count, as well as liver and renal profiles, were within the physiological parameters for canine species, showing no systemic adverse effects derived from the association of itraconazole and (1–3) β -glucan during the treatment. The material from the patient's lesions and secretions was then submitted for fungal culture, which was, at this time, negative, allowing us to interrupt the animal treatment (Fig. 2). Our findings demonstrated the efficacy of combining β -glucan and itraconazole during the treatment of canine sporotrichosis. Oliveira et al. [9] demonstrated that *S. brasiliensis* is the species that mostly responds to terbinafine, ketoconazole, itraconazole, and ampho-

tericin B in in vitro studies. However, in our study, the therapy with itraconazole only was not effective probably due to the agent resistance. According to Oliveira et al. [9], isolates from animals showed less sensitivity to azoles than strains of human origin.

During the macro-morphology analysis of the identified *S. brasiliensis* colonies, an intense pigmentation was observed, suggesting that there was a large amount of melanin, what may confer a higher resistance degree to the isolate. According to Bell and Wheeler [10], a certain amount of melanin provides essential protection against ultraviolet radiation, desiccation, and extreme temperatures; also, the degree of protection is directly proportional to the melanin concentration in the fungal cell. Melanin grants resistance to the fungal cell against effector cells of the immune system by reducing phagocytosis and protecting it against nitrogen and oxygen derivatives; also, melanin acts on the resistance of fungal cells against hydrolytic enzymes, such as chitinase and glucanase [7].

This study describes the first report on *S. brasiliensis* in dogs, demonstrating how important molecular studies are for the advance veterinary mycology. Another fact that stands out is that the fungus isolated from the canine proved to be refractory to itraconazole, even after 7 months of the treatment, so that the combination of immunomodulators can be an alternative for the treatment of ringworms. In human medicine, several studies associating with immunomodulatory therapies have been described, but in veterinary medicine, such studies are scarce and need to be further explored. Some authors positively position themselves to the use of immunomodulators for different pathologies, such as (1–3) β -glucan along with fluconazole for experimental cryptococcosis [12], and sepsis in experimental models [11], and the combination of (1–3) β -glucan and itraconazole for experimental systemic sporotrichosis [3]. The (1–3) β -glucan is a polysaccharide that consists of units of glicopiranoses bound by β 1-3 glycosidic linkages, of high molecular weight, extracted from the inner cell wall of the fungus *Saccharomyces cerevisiae* [11].

It has been reported that β -glucan has broad and potent activity in the reticuloendothelial system (RES), leading to its hypertrophy and hyperphagocytosis, due to the increase in macrophages' size and number [11].

Several mammalian cells, especially leukocytes, have receptors that are capable of recognizing and interacting with β -glucan. The known β -glucan receptors are CR3, lactosylceramide, and dectin-1, and the latter seems to have an essential role in the activation of the host defense [3]. The absence of β -glucanase in mammals is another factor that contributes to the activity of β -glucan, as well as its long permanence in these organic systems, thereby enabling the polysaccharide accumulation in organs of the RES without undergoing significant structural changes [3].

Conclusion

The use of immunomodulators, such as β -glucan, is promising for the treatment of sporotrichosis caused by *S. brasiliensis* and may be an alternative in cases of isolates resistant to antifungal treatments with itraconazole.

Acknowledgments The authors thank the funding agencies: CNPq, CAPES, and FAPERGS and also Professor Zoilo Pires de Camargo, from the Federal University of São Paulo, for the molecular identification of the agent *Sporothrix brasiliensis*.

References

1. Monteiro HRB, Taneno JC, Neves MF. Esporotricose em felinos domésticos. Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária Ano VI—Número 10—Janeiro de 2008—Periódicos Semestral.
2. Souza NT, Nascimento ACBM, Souza JOT, Santos FCGCA, Castro RB. Esporotricose canina: relato de Caso. ArqBrasMedVet Zoo. 2009;61:572–6.
3. Martins AA. Esporotricose sistêmica experimental: avaliação in vivo da b-(1–3) glucana e em associação ao itraconazol em modelo murino. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Veterinária, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, com o requisito parcial para obtenção do grau de Doutora. Porto Alegre, RS, 2012.
4. Marimon R, Cano J, Gené J, Sutton DA, Guarro J, Kawasaki M. *Sporothrix brasiliensis* *S. globosa* and *S. mexicana* Three New *Sporothrix* species of clinical interest. J Clin Microbiol. 2007;45:3198–206.
5. Vergara MLS, Camargo ZP, Silva PF, Abdalia MR, Sgarbieri RN, Rodrigues AM, Santos KC, Barata CH, Paim KF. Case report: disseminated *Sporothrix brasiliensis* infection with Endo cardiac and ocular involvement in a HIV—infected patient. Am J Trop Med Hyg. 2012;86:477–80.
6. Mendes JF, Martins AA, Matos CB, Santin R, Meireles MCA. Esporotricose cutânea experimental: Avaliação an-atomopatológica em diferentes tratamentos. XX Congresso de Iniciação Científica, II Mostra Científica da universidade Federal de Pelotas, 2011.

7. Madrid IM. Estudo de casos espontâneos de esporotricose canina e felina, e avaliação da melanina em células de *Sporothrix schenckii* em modelo murino. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Veterinária, da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Veterinária Preventiva), 2007.
8. Teixeira PAC. Estudo da virulência, adesão e características fenotípicas de isolados do complexo *Sporothrix*. Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2011.
9. Oliveira DC, Lopes PGM, Spader TB, Mahl CD, Alves GRT, Lara VM, Santurio JM, Alves SH. Antifungal Susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. luriei* of the *S. schenckii* complex identified in Brazil. *J Clin Microbiol.* 2011;49:3047–9.
10. Bell AA, Wheeler MH. Biosynthesis and functions of fungal melanins. *Annu Rev Phytopathol.* 1986;24:411–51.
11. Freitas JCOC, Medeiros AC, Sales VSF. Proteção pela glucana em modelo experimental de sepsis. *Acta Cir. Bras.* vol.19 no.3, São Paulo May/June 2004.
12. Faria RO. Avaliação da terapia com b - (1–3) glucana associada ao fluconazol na criptococose experimental. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Veterinárias, da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora. Porto Alegre, RS, 2010.

5 Considerações Finais

- Foram identificados um total de 46 isolados bacterianos de 40 cães com lesões cutâneas atendidos no Hospital de Clínicas Veterinária da UFPel, sendo 26 classificados como Gram positivos e 20 Gram negativos.
- No que se refere às bactérias Gram positivas, o gênero *Staphylococcus* se destacou, apresentando 73% de ocorrência. Em relação às bactérias Gram negativas, destacou-se o gênero *Pseudomonas* com 40% dos isolados bacterianos e em seguida o gênero *Proteus* e a espécie *Escherichia coli* foram os mais isolados, com 20% e 15% dos isolados Gram negativos, respectivamente.
- Os óleos essenciais da família Lamiaceae apresentam atividade *in vitro* frente aos isolados clínicos de bactérias multiresistentes, possuindo uma ação promissora como alternativa aos casos de resistência bacteriana que são cada vez mais observados dentro da clínica médica veterinária;
- O extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata*, não apresentou atividade nas concentrações testadas *in vitro* frente à maioria dos isolados bacterianos, necessitando de mais estudos a seu respeito utilizando outros extratos e outras concentrações, uma vez que a ação bactericida dessa planta já foi estudada com sucesso;
- Os isolados bacterianos provenientes de lesões cutâneas ulceradas de cães apresentaram-se em geral mais resistentes frente aos antibióticos β -lactâmicos e mais sensíveis frente à enrofloxacina;
- Os isolados de *Sporothrix brasiliensis* testados apresentaram CFM $\geq 64\mu\text{g/mL}$ quando utilizado o antifúngico padrão intraconazol;
- O extrato hidroalcoólico de *Bauhinia forficata* em concentrações de até 100mg/mL apresentou atividade fungistática *in vitro* frente ao *S. brasiliensis*, porém não apresentou atividade fungicida ($>100\text{mg/mL}$);
- Na análise cromatográfica, foram identificados 39 compostos químicos, sendo 9 compostos referentes ao óleo essencial de alecrim, onde os compostos majoritários foram Eucalyptol (1-8 cineol), Camphor e Alpha-pinene; 15 compostos referentes ao óleo essencial de manjerona, com 4-terpineol, 4-carene e 5-isopropyl-2-

methylobicyclo como majoritários e 15 compostos referentes ao óleo essencial de orégano, onde descaram-se o γ -terpinene, 4-terpineol e Hidroxy-p-cymene;

- O uso de imunomoduladores, como a β -glucana, é promissor no tratamento da esporotricose causada pelo *S. brasiliensis* refratário ao tratamento convencional com itraconazol.

Referências

ACOSTA, G. S. et al. Determinação da atividade da infusão de *Bauhinia forficata* no tratamento de ferida aberta de cão. In: SIMPÓSIO IBEROAMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS, VI.,2012, Ponta Grossa. Anais do VI Simpósio Iberoamericano de Plantas Mediciniais, Ponta Grossa: Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2012.

AGOSTINIS, R. O.; MELO, P. L.; MARTINS, L. A. Importância do mapeamento e monitoramento do perfil de resistência e detecção dos genes de resistência de *Staphylococcus* sp. relacionados à mastite bovina. **Arquivo Ciência Veterinária e Zoologia UNIPAR**, Umuarama, v. 15, n. 1, p. 57-65, 2012.

ALMENARA, F. S. et al. Ototoxicidade do Aminoglicosídeo. **Revista científica eletônica de medicina veterinária**, v.5, n.11, 2008.

ALVARENGA, A. L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.9, p.86-91, 2007.

ALVES, S. H. et al. *Sporothrix schenckii* associated with armadillo hunting in Southern Brazil: epidemiological and antifungal susceptibility profiles. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n.5, p. 523-525, 2010.

AMALSADVALA, T.; SWAIN, S.F. Management of hard-to-healwounds. **VeterinaryClinics of North America Small Animal Practice**,v.36, n.4, p.693-711, 2006.

ANDRADE, S. Franco. **Manual de terapêutica veterinária**. 2.ed. São Paulo: Roca; 2002.

ARIAS, M. V. B. et al. Identificação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias isoladas de cães e gatos com feridas traumáticas contaminadas e infectadas. **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 29, n. 4, p. 861-874, out./dez. 2008.

ARIAS, M. V. B.; CARRILHO, C. M. D. M. Resistência antimicrobiana nos animais e no ser humano. Há motivo para preocupação? **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 775-790, abr. 2012.

BARBOSA, D.C. et al. Dermatopatias piogênicas em cães de abrigo e padrões de sensibilidade aos antimicrobianos in vitro de cepas de *Staphylococcus pseudintermedius*. **Clínica Veterinária**, n.93, p.72-78, 2011.

BARROSO, G.M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 1986. v. 3, p. 98-118.

BAUER, A.W. et al. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v.36, p.493-496, 1966.

BELL, A. A.; WHEELER, M. H. Biosynthesis and functions of fungal melanins. **Annual Review of Phytopathology**, v.24, p. 411 – 451, 1986.

BORGES, T. S. et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* From the Claws of Domestic Cats (Indoor and Outdoor) and in Captivity in São Paulo (Brazil). **Mycopathologia**, v. 176, n. 1-2, p. 129-137, 2013.

BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana *in vitro* e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. 2006. 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões, Erechim, 2006.

BUSTAMANTE, B.; CAMPOS, P. Sporotrichosis: a forgotten disease in the drug research agenda. **Expert reviews Anti-Infectious Therapy**, v. 2, p.85-94, 2004.

CAMACHO, Natália Neutzling. **Expressão heteróloga da lectina de *Bauhinia forficata* Link em *Escherichia coli* e efeito sobre linhagens celulares tumorais**. 2007. 69f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Agrícola. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

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

CAVALCANTI, Máira Cruz de Holanda. **Alterações anatomopatológicas na região nasal de gatos domésticos com esporotricose: lesões sem tratamento e lesões refratárias**. 72f. 2010. Dissertação (mestrado) – Instituto de Pesquisa Clínica

Evandro Chagas, Pós-Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infecciosas, Rio de Janeiro, 2010.

CHAMI, N. et al. Antifungal Treatment With Carvacrol and Eugenol of Oral Candidiasis in Immunosuppressed Rats. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, p.217-226, v.8, n.3, 2004.

CLEFF, Marlete Brum. **Avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. frente a fungos de importância em veterinária com ênfase em *Candida spp.*** 129f.2008. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2008.

CLEFF, M. B. et al. Dificuldades terapêuticas no tratamento da esporotricose felina. **12ª Mostra de Produção Universitária**. Rio Grande – RS, Brasil, 2013.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Eighth Edition. CLSI document M7-A8. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009.

CONTE, Ana Paula. **Demodicose canina generalizada: relato de caso**. 12f.2008. Monografia (Curso de Especialização *Latu Sensu* em Clínica Médica e Cirúrgica de Pequenos Animais) Curitiba, 2008.

CROTHERS, S.L. et al. Sporotrichosis: a retrospective evaluation of 23 cases seen in northern California (1987-2007). **Veterinary Dermatology**, v.20, n.4, p.249-59, 2009.

CRUZ, A.R.; PAES, A.C.; SIQUEIRA, A.K. Perfil de sensibilidade de bactérias patogênicas isoladas de cães frente a antimicrobianos. **Veterinaria e Zootecnia.**, v.19, n.4, p.601-610, 2012.

D'AVILA, C.A. et al. Atividade *in vitro* de *Rosmarinus officinalis* frente a cepas do complexo *Sporothrix sp.* In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, XXII., 2013. **Anais do XXII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2013.

Di STASI, L. C. Arte, ciência e magia. In LC Di Stasi, CA Hiruma-Lima (eds), **Plantas Medicinais: Arte e Ciência**, Unesp, São Paulo, p. 15-21, 1996.

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

FETROW, C. W.; AVILA, J. R. **Manual de medicina alternativa**. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 743p.

FREITAS, J. C. O. C.; MEDEIROS, A. C.; SALES, V. S. F. Proteção pela glucana em modelo experimental de sepse. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.19, n.3, p. 296-307, 2004.

FRENCH, G.L. Clinical impact and relevance of antibiotic resistance. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v.57, n.10, p. 1514-1527, 2005.

GALIZA, G. J. N. et al. Ocorrência de micoses e pitiose em animais domésticos: 230 casos. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.3, p. 224-232, 2014.

GEORGIEVA, R. N. **Produção de biofilme em Staphylococci isolados da pele de canídeos**. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária. 2012, Lisboa, 101p.

GOMES, A. R. et al. Dermatopatias fúngicas: aspectos clínicos, diagnósticos e terapêuticos. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.6, n.4, p.272-284, 2012.

GIORDANI, Cláudia. **Investigação de plantas medicinais e tóxicas em Pelotas-RS e determinação da atividade antifúngica frente a *Malassezia pachydermatis***. 2013. 26f. Dissertação (Mestrado em Clínica Veterinária)- Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2013.

GREMIÃO, Isabella Dib Ferreira. **Tratamento da esporotricose felina com a associação de Anfotericina b intralesional e Itraconazol oral**. Tese (doutorado) apresentada ao Curso de Pós Graduação em Pesquisa Clínica em Doenças Infeciosas do Instituto de Pesquisa Clínica Evandro Chagas para obtenção do grau de Doutor em Ciências. 2010.

GUILLOT, J.; BOND, R. *Malassezia pachydermatis*: a review. **Medical Mycology**, v. 37, n. 5, p. 295-306, 1999.

HAIDA, K. S. et al. Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivo de Ciências da Saúde da Unipar**, v. 11, n. 3, p. 185-192, 2007.

HIRANO, M. et al. A case of feline sporotrichosis. **Journal of Veterinary Medical Science**, v.68, n.3, p. 283-284, 2006.

HUSSAIN, A.I. et al. *Rosmarinus officinalis* essential oil: antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. **Brazilian Journal Microbiology**, v.41, n.4, p.1070-1078, 2010.

INDIANARA, C. E. et. al. Controle de qualidade de drogas vegetais a base de *Bauhinia forficata* Link (Fabaceae). **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n.2, p. 258-264, 2008.

ISHII, J.B.; FREITAS, J.C.; ARIAS, M.V.B. Resistência de bactérias isoladas de cães e gatos no Hospital Veterinário da Universidade Estadual de Londrina (2008-2009). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.6, p.533-537, 2011.

JAKIEMIU, E. A. R. et al. Estudo da composição e do rendimento do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.). **Revista Semina: Ciências Agrárias**, v.31, n.3, p. 683-688, 2010.

KAZIYAMA, V.M.; FERNANDES, M.J.B.; SIMONI, I.C. Atividade antiviral de extratos de plantas medicinais disponíveis comercialmente frente aos herpesvírus suíno e bovino. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.3, p.522-528, 2012.

KEMPFER, C. B. et al. Culturas de secreções de pele: estudo de prevalência e sensibilidade aos antimicrobianos em um hospital universitário. **Revista Saúde**, v. 36, n. 1, p.5766, jan./jun. 2010.

KRUTH, S. A. **Gram-negative bacterial infections**. In: GREENE, C. E. Infectious diseases of the dog and cat. 3.ed. Saint Louis: Saunders/Elsevier, 2006. p. 320-330.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; HEINS-VACCARI, E.M.; MELO, N.T. **Tratado de Micologia Médica**. Ed.: Savier, São Paulo, 9ª Ed., 2002, p. 479-497.

LAM, L. K. T.; ZHENG, B. Effects of essential oils on Glutation S- transferase activity in mice. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.39, p.660-662, 1991.

LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J. A. Study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal Applied of Microbiology**, v.91, p.453-462, 2001.

LARSSON, C. E. Esporotricose. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 48, n. 3, p. 250-259, 2011.

LAVADOURO, J.B.et al. Dificuldades terapêuticas no tratamento da esporotricose felina. In: Mostra de Produção Universitária da Universidade Federal de Rio Grande, 12., 2013. **Anais da 12ª Mostra de Produção Universitária da Universidade Federal de Rio Grande**, Rio Grande: Universidade Federal de Rio Grande, 2013.

LIMA, C. O. et al. Antimicrobial effect of the essential oil from *Rosmarinus officinalis* L. against *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from dogs. **Revista Brasileira de Biociência**, v.11, n.3, p. 280-283, 2013.

LONDERO, A. T; CASTRO, R. M; FISCHMAN, O. Two cases of sporotrichosis in dog in Brazil. **Sabouraudia**, v.3, p.273-274, 1964.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Nova Odessa, São Paulo: Instituto Plantarum, 2002.

LUCARINI, R. **Extratos brutos do alecrim como potencial agente antibacteriano frente ao *Clostridium perfringens***. In: 31ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2008, Águas de Lindóia, Brasil. Águas de Lindóia, 2008.

LUSA, M. G.; BONA, C. Análise morfoanatômica comparativa da folha de *Bauhinia forficata* Link e *B. variegata* Linn. (Leguminosae, Caesalpinioideae). **Acta Botânica Brasileira**, v.23, n.1, 2009.

MADRID, I. M. **Estudo de casos espontâneos de esporotricose canina e felina, e avaliação da melanina em células de *Sporothrix schenckii* em modelo murino**. 2007. 83f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2007.

MADRID, I.M.; SANTOS, J. R. R.; SAMPAIO, J. R. D. P. Esporotricose canina: relato de três casos. *Acta Scientiae Veterinariae*, v.35, p.105-108, 2007.

MADRID, I.M.; MATTEI, A.; MARTINS, A.; NOBRE, M. O.; MEIRELES, M. C. A. Feline Sporotrichosis in the Southern Region of Rio Grande Do Sul, Brazil: Clinical, Zoonotic and Therapeutic Aspects. **Zoonoses and Public Health**, v.57, n.2, p.151-154, 2010.

MADRID, I.M. et al. Epidemiological Findings and Laboratory Evaluation of Sporotrichosis: A Description of 103 Cases in Cats and Dogs in Southern Brazil. **Mycopathologia**, v. 173, n. 4, p. 265-273, 2012.

MADRID, I. M.; TELES, A. J.; SANTIN, R.; MATTEI, A. S.; GOMES, A.; WALLER, S. Eficácia de soluções desinfetantes na eliminação de fungos de importância médica e veterinária. **Archives of Veterinary Science**, v. 18, n.1, p.65 – 70, 2013.

MANOHAR, V. et al. Antifungal activities of organum oil against *Candida albicans*. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v.228, p.111-117, 2001.

MANTESE, O. C. Pneumococo resistente à penicilina: implicações práticas. **Jornal de Pediatria**, v. 75, 1999.

MARIMON, R. et al. *Sporothrix brasiliensis* S. *globose* and *S. mexicana*. Three New Sporothrix species of clinical interest. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 45, n.3, p. 198–206, 2007.

MARQUES, S.A.; FRANCO, S.R.V.S.; CAMARGO, R.M.P.; DIAS, L.D.F.; HADDAD, J. R. V., FABRIS, V.E. Esporotricose do gato doméstico (*Felis catus*): transmissão humana. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.35, n.4, p.327-330, 1993.

MARTINS, A. **Avaliação do uso do imunomodulador β (1-3) glucana isoladamente e em associação ao Itraconazol na esporotricose experimental**. 2008. 83f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2008.

MARTINS, A. **Esporotricose sistêmica experimental: Avaliação *in vivo* da β -(1-3) glucana e em associação ao itraconazol em modelo murino**. 2012. Porto Alegre, 119f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

MARTINS, D. B.; DECKMANN, M. A. J.; SPEROTTO, V. R. Criptococose cutânea associada à severa infestação por *Sarcoptes* sp. e *Demodex* sp. em um cão. **Ciência Rural**, v.44, n.8, p. 1437-1441, 2014.

MATOS, C.B. et al. Dermatite multifatorial em um canino. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.64, n.6, p.1478-1482, 2012.

MATOS, Caroline Bohnen. **Eficácia de extratos vegetais na desinfecção de superfícies contaminadas com fungos do complexo *Sporothrix***. 2014. f. 83 Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

MATOS, E. O. et al. Prevalência de agentes microbianos e sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. **Revista Paraense de Medicina**, v.28, n.2, p.35-43, 2014.

MAY, E. R. et al. Isolation of *Staphylococcus schleiferi* from healthy dogs and dogs with otitis, pyoderma or both. **Journal of American Veterinary Medical Association**, v.227, p. 928-931, 2006.

MEINERZ, A.R.; NASCENTE, P.S.; SCHUCH, L.F.; FARIA, R.O.; SANTIN, R.; CLEFF, M.B.; MADRID, I.M.; MARTINS, A.M.; NOBRE, M.O.; MEIRELES, M.C.A.; MELLO, J.R.B. Esporotricose felina – relato de casos. **Ciência Animal Brasileira**, v.8, n.3, p. 575-577, 2007.

MEIRELES, M. A. O. M. **Uso de antimicrobianos e resistência bacteriana: aspectos socioeconômicos e comportamentais e seu impacto clínico e ecológico**. 2008. 47f. Monografia apresentada ao Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, 2008.

MELLO, M. R. S. **Deteção da atividade da enzima carbapenemase em Enterobacteriaceae e *Pseudomonas aeruginosa* isoladas em clínicas veterinárias do Distrito Federal, Brasil**. 2014. 38 f. Dissertação (Mestrado em Saúde Animal) - Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

MENEZES, F.S. et al. Hypoglycemic activity of two Brazilian *Bauhinia* species: *Bauhinia forficata* L. and *Bauhinia monandra* Kurz. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p. 8-13, 2007.

MENEZES, T.O.A. et al. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica de óleos essenciais e extratos de plantas da região amazônica sobre cepa de *Candida albicans*. **Revista de Odontologia da UNESP**, v.38, n.3, p.184-191, 2009.

MENDES, Z. F. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana da tintura e pomada de *Ruta graveolens* (Arruda) sobre bactérias isoladas de feridas cutâneas em cães. **Medicina Veterinária, Recife**, v.2, n.3, p.32-36, 2008.

MENDES, J. F. et al. **Esporotricose cutânea experimental : Avaliação anatomopatológica em diferentes tratamentos**. XX Congresso de Iniciação Científica, II Mostra Científica da universidade Federal de Pelotas, 2011.

MICHELIN, D.C. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.4, p. 316-320, 2005.

MIMICA, M. J. Ceftobiprole: uma nova cefalosporina com ação contra *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina. **Arquivo Médico dos Hospitais e Faculdade Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo**, v.56, n.2, p. 107-111, 2011.

MONTEIRO, H.R.B.; TANENO, J.C.; NEVES, M.F. Esporotricose em felinos domésticos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.6, n.10, 2008.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. et al. Citotocividade e atividade antiparasitária de *Lygodium venustum* SW. **Acta Toxicológica Argentina**, v.21, n.1, p. 49-55, 2013.

MOTA, R., A. et al. Utilização indiscriminada de antimicrobianos e sua contribuição a multirresistência bacteriana. **Brazilian Journal of Veterinary Research Animal Science**, v. 42, n. 6, p. 465-470, 2005.

MOTTIN, V.D. et al. Dermatopatias em pequenos animais na rotina clínica do HVU-ULBRA, Canoas, RS: um estudo retrospectivo. **Anais 35º Conbravet**, Gramado, RS, 2008.

MULLER, G.H.; KIRK, R.W. **Dermatologia de pequenos animais**. Rio de Janeiro: Interlivros, 2003. p.88-103.

NOBRE, M. O. et al. Recurrence of sporotrichosis in cats with zoonotic involvement. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v.18, p.137-140, 2001.

NOBRE, M. O. et al. Antifungal drugs for small and large animals. **Ciência Rural**, v.32, n.1, p. 175-184, 2002.

OLIVEIRA, A.C.; CIOSAK, S.I. Infecção de sítio cirúrgico no seguimento pós-alta: impacto na incidência e avaliação dos métodos utilizados. **Revista da Escola Enfermagem USP**, v.38, n.4, p.379-385, 2004.

OLIVEIRA, L. C. et al. Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.57, p. 405-408, 2005.

OLIVEIRA, J. F. P.; CIPULLO, J. P.; BURDMANN, E. A. Nefrotoxicidade dos aminoglicosídeos. **Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery**, v.21, n.4, p.444-452, 2006.

OLIVEIRA, D. C. et al. Antifungal Susceptibilities of *Sporothrix albicans*, *S. brasiliensis*, and *S. Luriei* of the *S. schenckii* Complex Identified in Brazil. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 49, n. 8, p. 3047–3049, 2011.

OLIVEIRA, M. M. et al. Phenotypic and molecular identification of *Sporothrix* isolates from an epidemic area of sporotrichosis in Brazil. **Mycopathologia**, v.172, p. 257-67, 2011.

OUSSALAH, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157: H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v.18, p. 414-20, 2007.

PAVLETIC, M. M.; TROUT, N. J. Bullet, bite, and burn wounds in dogs and cats. **The Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**, v. 36, n. 4, p. 873-93, 2006.

PENA, S. B. **Frequência de dermatopatias infecciosas, parasitárias e neoplásicas em cães na região de Graça, São Paulo – Brasil**. 2009. 12f. Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia da UNESP, São Paulo, 2009.

PESSOA, Vanessa da Silva. **Pseudomonas aeruginosa: epidemiologia e resistência a antimicrobianos em hospital universitário do sudeste do Brasil**. 2013. 49f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

PEPATO, M. T. et al. Evaluation of toxicity after one-months treatment with *Bauhinia forficata* decoction in streptozotocin-induced diabetic rats. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v.4, n.7, p. 1-7, 2004.

PEREIRA, D. M. S. et al. Indução e caracterização morfológica e bioquímica de calos de *Hyptis leucocephala* (Lamiaceae) Sitientibus série. **Ciências Biológicas**, v.12, n.1, p. 151–156. 2012.

POMBA-FÉRIA, C. et al. ***In vitro* activity of enrofloxacin, marbofloxacin and ciprofloxacin against clinical strains of *Pseudomonas* spp. isolated from small animals on Portugal.** In: world small animal veterinary association, Irland. *Proceedings*. Dublin, 2002.

PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p.193-210, 2001.

POZZO, M.D.; VIÉGAS, J.; SANTURIO, D.F. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v.41, n.4, p.667-672, 2011.

RATSLAFF, K. et al. Ação dos extratos hidroalcoólico de *Schinus terebinthifolius*, *Baccharis trimera* e *Solidago chilensis* em *Sporothrix schenckii*. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, XII., 2013, Pelotas. **Anais do XII Congresso de Iniciação Científica da Universidade Federal de Pelotas**, Pelotas: Universidade Federal de Pelotas, 2013.

RIBEIRO, Daniele Silva. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) frente a bactérias isoladas de alimentos: estudos *in vitro* e em matriz alimentícia.** 2011. 102f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Faculdade de Farmácia, Universidade federal da Bahia, Salvador.

RODRIGUES, P. R.C. et al. O uso das cefalosporinas na clinica de pequenos animais: breve revisão. **Veterinária em foco**, v.4, n.2, p.-143-158, 2007.

RODRIGUES, A. M. **Taxonomia polifásica e características proteômicas do complexo *Sporothrix schenckii*** [dissertação]. São Paulo: Universidade Federal de São Paulo; 2010.

RODRIGUES, A. M. et al. Phylogenetic Analysis Reveals a High Prevalence of *Sporothrix brasiliensis* in Feline Sporotrichosis Outbreaks. **PLOS Neglected Tropical Diseases**., 20;7 (6): 2281, 2013.

ROMERO, A. L. et al. Composição química e atividade do óleo essencial de *Origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, 2012.

SAEED, S.; TARIQ, P. Antibacterial activity of oregano (*Origanum vulgare* Linn.) against gram positive bacteria. **Pakistan Journal of Pharmaceutical Science**, v.22, n.4, p.421-424, 2009.

SALAZAR, Ana Sofia Leal Marques Oliveira. **Estudo da resistência às cefalosporinas de terceira geração de isolados de *Escherichia coli* de origem canina**. 2011. 81f. Dissertação (mestrado integrado) em Medicina Veterinária. Universidade Técnica de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária. Lisboa, 2011.

SANTIN, Rosema. **Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae**. 2013. 104f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, RS, 2013.

SANTIN, R. et al. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.66, n.2, p.367-373, 2014.

SANTOS, M. R. et al. Suscetibilidade a antimicrobianos, de bactérias isoladas de diversas patologias em cães e gatos, nos anos de 2002 e 2003. **Veterinária em Foco**, v.2, n.2, p.157-164, 2005.

SANTURIO, D. F. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, v.41, n.6, p.1051-1056, 2011.

SCHOLAR, E. M. Fluoroquinolones: Past, present and future of a novel group of antibacterial agents. **American Journal of Pharmaceutical Education**, v. 66, p.164-172, 2002.

SCHIEDECK, G. et al. Método de preparo de tintura de plantas bioativas para fins agrícolas. **Comunicado técnico-EMBRAPA- Pelotas**, n.190, p.1-4, 2008.

SCHUBACH, T.M.P.; SCHUBACH, A.O. Esporotricose em gatos e cães - revisão. **Clínica Veterinária**, v. 5, n.29, p. 21-24, 2000.

SCHUBACH, T.M.P. et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of domestic cats (*Felis catus*). **Medical Mycology**, v. 39, p147-149, 2001.

SCHUBACH, T. M. P. et al. Utilidade do coágulo sanguíneo para o isolamento de *Sporothrixschenckii*de gatos naturalmente infectados. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.41, p.404-408, 2004.

SCHUBACH, T. M. P. et al. Canine sporotrichosis in Rio de Janeiro, Brazil: clinical presentation, laboratory diagnosis and therapeutic response in 44 cases (1998-2003). **Medical Micology**, v44, p.87-92, 2006.

SCHUBACH, A.; BARROS, M. B.; WANKE, B. Epidemic sporotrichosis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 129-133, 2008.

SCOTT, D.W., MILLER, D. H.; GRIFFIN, C. E. 2001. **Muller and Kirk's Small Animal Dermatology**.6.ed. Philadelphia: Saunders. 1528p.

SEIXAS, P. **Efeito da adubação mineral na produção de biomassa, teor e composição do óleo essencial e fungitoxicidade in vitro do capim-citronela**. 2012, 89f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal do Tocantins, Gurupi.

SILVA, A. et al. Suscetibilidade antimicrobiana de *Staphylococcus* spp. isolados de cães com pioderma superficial. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.34, n.4, p. 355-361, 2014.

SILVA, K.L.; CECHINEL FILHO, V. **Plantas do gênero Bauhinia: composição química e potencial farmacológico**. Química Nova: 449-454. 2002.

SILVA, K. L.; FILHO, V. C. Plantas do gênero *Bauhinia*: composição química e potencial farmacológico. **Química Nova**, v.25, n.3, p. 449-454, 2002.

SILVA, A. C. et al. Efeito *in vitro* de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz: isolado do maracujazeiro. **Ciências e Agrotecnologia**, v.33, p.1853-1860, 2009.

SILVA, J.M.B.; HOLLENBACH, C.B. Fluoroquinolonas x resistência bacteriana na Medicina Veterinária. **Arquivo do Instituto de Biologia**, São Paulo, v.77, n.2, p.363-369, 2010.

SILVA, Mayara Gobetti Fernandes. **Atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais e extratos hidroalcóolicos de manjerona (*Origanum majorana* L.) e manjeriço (*Ocimum basilicum* L.)**. 2011. 70f. Trabalho de conclusão de curso, apresentado à Comissão de Diplomação do Curso de Bacharelado em Química da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Pato Branco, como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Química, 2011.

SILVEIRA, F. S.; MIOTTO, S. T. S. A família Fabaceae no Morro Santana, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil: aspectos taxonômicos e ecológicos. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 11, n. 1, p. 93-114, 2013.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2003. 1102p.

SINGER, R. S. et al. Antibiotic resistance – the interplay between antibiotic use in animals and human beings. **Lancet Infectious Diseases**, v. 3, n. 1, p. 47-51, 2003.

SOUZA, E. et al. Hypoglycemic Effect and Antioxidant Potential of Kaempferol-3,7-O-(r) dirhamnoside from *Bauhinia forficata* Leaves. *Journal Natural Products* v.67, p. 829-832, 2004.

SOUZA, L. L. et al. Isolation of *Sporothrix schenckii* from the nails of healthy cats. **Brazilian Journal Microbiology**, v.37, p.303-305, 2006.

SOUZA, M. V. N.; VASCONCELOS, T. R. A. Fármacos no combate à tuberculose: passado, presente e futuro. **Química Nova**. v.28, n.4, 2005.

SOUZA, R. S. S.; SANTOS, D. R.; BELLA CRUZ, R. C. VI Seminário Integrado de Iniciação Científica, Camboriú, Brasil, 2000.

SOUZA, V. B.; OLIVEIRA, R. F.; FERREIRA, A.; JÚNIOR, R. A. Alterações Renais por Aminoglicosídeos. **Arquivos de Medicina**, v.22, n.4/5, p. 131-5, 2008.

SOUZA, N. T. et al. Esporotricose canina: relato de Caso. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.61, p. 572–6, 2009.

SOUZA, N.A.B. **Possíveis mecanismos de atividade antifúngica de óleos essenciais contra fungos patogênicos**. 2010. 150f. Tese (Doutorado em Produtos

Naturais e Sintéticos Bioativos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

TAVARES, W. Bactérias gram-positivas problemas: resistência do estafilococo, do enterococo e do pneumococo aos antimicrobianos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.33, n.3, p.281-301, 2000.

TEIXEIRA, Pedro Antônio Castelo. **Estudo da virulência, adesão e características fenotípicas de isolados do complexo Sporothrix**. 2011. 122f. Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao programa de Pós-graduação em Biociências, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro, 2011.

ULTEE, A.; SMID, E.J. **Influence of carvacrol on growth and toxin production by Bacillus cereus**. International Journal Food of Microbiology, v.64, 373-378, 2001.

VATTEM, D. A.; RANDHIR, R.; SHETTY, K. cranberry phenolics-mediated antioxidant enzyme response in oxidatively stressed porcine muscle. **Process biochemistry**, v. 40, p.2225-2238, 2005.

VAZ, A. M. S. F.; TOZZI, A. M. G. A. Sinopse de Bauhinia sect. Pauletia (Cav.) DC. (Leguminosae: Caesalpinioideae: Cercideae) no Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v.28, n.3, p.477-491, 2005.

VERGARA, M. L. S. et al. Casereport: disseminated Sporothrix brasiliensis infection with Endo cardial and ocular involvement in a HIV— infected patient. **American Journal of Tropical Medicine Hygiene**, v.86, p. 477–480, 2012.

VIEIRA, Juliana Maciel Cassali. **Tratamento da piodermite recidivante em cães e gatos causadas por microrganismos multirresistentes**. 2012. 44f. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao programa de Graduação em Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.

WEESE, J.S. et al. Suspected transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* between domestic pets and humans in veterinary clinics and in the household. **Veterinary Microbiology**, v.115, p.148-155, 2006.

WELSH, R.D. Sporotrichosis. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 223, n. 8, p.1123-6, 2003.

Apêndice

Apêndice A -Tabela 1. Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais de alecrim, manjerona e orégano ($\mu\text{g/mL}$) frente bactérias Gram positivas isoladas de feridas contaminadas de animais

Isolados	Alecrim		Manjerona		Orégano	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
1	31,2	31,2	1,9	7,8	1,9	31,2
2	1,9	31,2	0,4	0,4	1,9	125
3	7,8	31,2	0,9	3,9	7,8	7,8
4	15,6	15,6	7,8	62,5	3,9	3,9
5	125	>250	125	125	15,6	31,2
6	7,8	125	62,5	62,5	3,9	62,5
7	0,9	0,9	3,9	3,9	1,9	7,8
8	15,6	15,6	31,2	31,2	3,9	3,9
9	250	250	7,8	62,5	31,2	31,2
10	3,9	7,8	0,4	0,9	1,9	3,9
11	250	250	31,2	31,2	15,6	15,6
12	250	250	31,2	31,2	7,8	125
13	31,2	125	15,6	15,6	7,8	15,6
14	31,2	125	7,8	15,6	7,8	15,6
15	125	125	62,5	125	31,2	31,2
16	31,2	31,2	15,6	15,6	7,8	15,6
17	31,2	31,2	15,6	15,6	15,6	15,6
18	31,2	250	31,2	31,2	3,9	7,8
19	15,6	15,6	0,9	7,8	1,9	3,9
20	15,6	15,6	0,9	7,8	3,9	7,8
21	15,6	15,6	1,9	15,6	1,9	3,9
22	7,8	7,8	31,2	31,2	3,9	3,9
23	7,8	15,6	31,2	31,2	3,9	3,9
24	0,4	0,4	15,6	125	3,9	7,8
25	15,6	15,6	7,8	125	3,9	3,9
26	125	125	7,8	7,8	1,9	3,9
27	125	125	3,9	62,5	3,9	7,8
28	250	>250	7,8	15,6	3,9	3,9
29	250	250	7,8	31,2	3,9	3,9
30	15,6	31,2	15,6	15,6	31,2	31,2
31	15,6	125	31,2	31,2	15,6	31,2
32	7,8	62,5	7,8	31,2	31,2	62,5
33	15,6	15,6	7,8	31,2	1,9	7,8

*Valores de >250 correspondem a concentração sem atividade inibitória/bacteriana. 1 *Staphylococcus intermedius*, 2 *Streptococcus pluranimalium*, 3 *Staphylococcus aureus*, 4 *Staphylococcus hominis*, 5 *Enterococcus faecium*, 6 *Staphylococcus sp.*, 7 *Streptococcus dysgalactiae*, 8 *Staphylococcus intermedius*, 9 *Staphylococcus aureus*, 10 *Streptococcus pluranimalium*, 11 *Staphylococcus intermedius*, 12 *Staphylococcus hyicus*, 13 *Staphylococcus xylosus*, 14 *Staphylococcus intermedius*, 15 *Enterococcus faecalis*, 16 *Staphylococcus aureus*, 18 *Enterococcus faecalis*, 19 *Staphylococcus aureus*, 20 *Streptococcus sp.*, 21 *Staphylococcus xylosus*, 22 *Staphylococcus xylosus*, 23 *Streptococcus pluranimalium*, 24 *Staphylococcus intermedius*, 25 *Alloiooccus otitis*, 26 *Staphylococcus intermedius*, 27 *Staphylococcus xylosus*, 28 *Staphylococcus intermedius*, 29 *Staphylococcus xylosus*, 30 *Enterococcus faecium*, 31 *Staphylococcus intermedius*, 32 *Staphylococcus aureus*, 33 *Alloiooccus otitis*

Apêndice B - Tabela 2. Resultados da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos óleos essenciais de alecrim, manjerona e orégano ($\mu\text{g/mL}$) frente bactérias Gram negativas isoladas de feridas contaminadas de animais

Isolados	Alecrim		Manjerona		Orégano	
	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)	CIM ($\mu\text{g/mL}$)	CBM ($\mu\text{g/mL}$)
1	>250	>250	250	250	>250	>250
2	250	250	31.2	31.2	62.5	62.5
3	7.8	62.5	1.9	1.9	0.4	1.9
4	0.4	0.4	3.9	3.9	0.4	0.4
5	0.9	0.9	0.4	1.9	0.4	0.4
6	>250	>250	250	250	>250	>250
7	15.6	125	3.9	3.9	3.9	7.8
8	7.8	62.5	3.9	7.8	1.9	1.9
9	7.8	125	7.8	62.5	1.9	1.9
10	7.8	7.8	1.9	15.6	0.9	0.9
11	15.6	31.2	3.9	3.9	0.9	0.9
12	>250	>250	250	250	>250	>250
13	7.8	15.6	3.9	3.9	1.9	15.6
14	7.8	15.6	3.9	3.9	1.9	3.9
15	>250	>250	250	250	>250	>250
16	>250	>250	250	250	>250	>250
17	31.2	15.6	3.9	31.2	0.9	3.9
18	7.8	15.6	3.9	3.9	1.9	15.6
19	>250	>250	250	>250	>250	>250
20	1.9	1.9	1.9	3.9	0.9	1.9
21	>250	>250	>250	>250	>250	>250
22	7.8	15.6	7.8	15.6	3.9	62.5
23	31.2	31.2	3.9	7.8	0.9	7.8
24	15.6	15.6	3.9	3.9	0.9	1.9
25	>250	>250	>250	>250	>250	>250
26	>250	>250	250	250	>250	>250

*Valores de >250 correspondem a concentração sem atividade inibitória/bacteriana. 1 *Pseudomonas aeruginosa*, 2 *Pseudomonas aeruginosa*, 3 *Escherichia coli*, 4 *Escherichia coli*, 5 *Aeromonas hydrophila*, 6 *Pseudomonas aeruginosa*, 7 *Enterobacter cloacae* complex, 8 *Escherichia coli*, 9 *Enterobacter aerogenes*, 10 *Proteus mirabilis*, 11 *Proteus mirabilis*, 12 *Pseudomonas putida*, 13 *Klebsiella pneumoniae*, 14 *Enterobacter cloacae* complex, 15 *Pseudomonas aeruginosa*, 16 *Pseudomonas aeruginosa*, 17 *Proteus vulgaris*, 18 *Escherichia coli*, 19 *Pseudomonas aeruginosa*, 20 *Escherichia coli*, 21 *Pseudomonas aeruginosa*, 22 *Pseudomonas aeruginosa*, 23 *Proteus vulgaris*, 24 *Proteus vulgaris*, 25, *Escherichia coli*, 26 *Pseudomonas aeruginosa*.