

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



TESE

“Perfil de resistência de *Pseudomonas* spp. isoladas de cães e ação antibacteriana e toxicidade de óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae”

Karina Affeldt Guterres

Pelotas, 2019

Karina Affeldt Guterres

“Perfil de resistência de *Pseudomonas* spp. isoladas de cães e ação antibacteriana e toxicidade de óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae”

Tese 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 Doutora em Ciências (área de concentração: Sanidade Animal).

Orientadora: Marlete Brum Cleff

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

G983p Guterres, Karina

Perfil de resistência de *Pseudomonas* spp. isoladas de cães e ação antibacteriana e toxicidade de óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae / Karina Guterres ; Marlete Brum Cleff, orientadora. — Pelotas, 2019.

97 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, 2019.

1. *Pseudomonas aeruginosa*. 2. Casa. 3. Citometria de fluxo. 4. Família lamiaceae. 5. Sinergismo. I. Cleff, Marlete Brum, orient. II. Título.

CDD : 636.7089

Karina Affeldt Guterres

“Perfil de resistência de *Pseudomonas* spp. isoladas de cães e ação antibacteriana e toxicidade de óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae”

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

Data da defesa: 27/02/2019

Banca examinadora:

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

Dr. Silvia Regina Leal Ladeira
Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidad Nacional de La Plata, Argentina

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

Prof. Dr. Claudia Giordani
Doutor em Ciência Animal pela Universidade Federal de Pelotas

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), em especial a Médica Veterinária Silvia Ladeira, 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, estagiários 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, Cris, Sol, Ceres e Helena pelo companheirismo, amizade, ajuda nos momentos difíceis, conversas, trabalhos e principalmente pelos momentos de diversão e risadas que passamos juntas.

Ao professor Rogério Freitag pela disponibilização do Laboratório de Química e ajuda nesta pesquisa.

Ao Laboratório de Virologia e Grupo Repropel, por toda a ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

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!

Resumo

GUTERRES, Karina Affeldt. **“Perfil de resistência de *Pseudomonas* spp. isoladas de cães e ação antibacteriana e toxicidade de óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae”**. 2019. 97f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

As afecções dermatológicas apresentam grande importância em pequenos animais, destacando-se as infecções pelo gênero *Pseudomonas*, que se apresenta resistente a maioria dos antimicrobianos utilizados na clínica médica. A resistência bacteriana é fonte de preocupação, aumentando as pesquisas em busca de novas opções terapêuticas, como as plantas medicinais, podendo-se citar a Família Lamiaceae. Assim, o objetivo do trabalho foi verificar a casuística de *Pseudomonas aeruginosa* em amostras de otites de cães recebidas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD), determinar o perfil de resistência da mesma a antimicrobianos e aos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*, avaliar um possível sinergismo dos óleos com antimicrobianos, assim como determinar a composição química dos óleos e a citotoxicidade destes em células MDBK e em espermatozoides, através dos métodos CASA e citometria de fluxo. Para o levantamento da casuística de otites registradas no LRD, avaliou-se todas as fichas de 2010 a 2018 de cães, sendo selecionadas aquelas com isolamento de *P. aeruginosa*. Os óleos essenciais utilizados no estudo, foram obtidos através de hidrodestilação por arraste à vapor, sendo testados nas concentrações de $250\mu\text{g/mL}^{-1}$. Para o antibiograma utilizou-se 13 fármacos, sendo que para avaliação da susceptibilidade de *Pseudomonas* spp. aos óleos essenciais e para a associação dos antimicrobianos com os óleos, o método de difusão em disco (Kirby-Bauer, 1966) foi usado. Para avaliação da citotoxicidade, utilizou-se células renais (MDBK) e células espermáticas, sendo a toxicidade de MDBK avaliada pelo método MTT e dos espermatozoides por CASA e citometria de fluxo. *P. aeruginosa* esteve presente em 11% das amostras de otite canina recebidas entre 2010 e 2018 no LRD. Os isolados caninos de *Pseudomonas* spp. apresentaram alta taxa de multiresistência (46,7%) aos antimicrobianos, em especial aos Beta-lactâmicos, sendo sensíveis para Quinolonas, Gentamicina e Imipenem. Os óleos essenciais inibiram *Pseudomonas* spp., formando halos de inibição maiores para OERO seguido de OEOM e OEOV. Quando se avaliou os óleos essenciais com os antimicrobianos, observou-se sinergismo em 90% das associações. OEOV e OEOM apresentaram composição majoritária de Gamma-Terpinene, 4-Terpineol e Alpha-Terpinene, enquanto em OERO destacaram-se Cineole, Alpha-Pinene e Camphor. Todos os óleos apresentaram citotoxicidade alta à partir de $0,24\mu\text{g/mL}^{-1}$ para MDBK, sendo OERO o mais citotóxico. No CASA, observou-se aumento na motilidade das células espermáticas nas concentrações de $20\mu\text{g/mL}^{-1}$ e $40\mu\text{g/mL}^{-1}$ em 0 e 24hs de exposição ao OEOV sendo que ocorreu redução destas à partir de $160\mu\text{g/mL}^{-1}$. OEOM na concentração de $20\mu\text{g/mL}^{-1}$ não alterou MT e MP, Distância média percorrida, Amplitude do deslocamento lateral da cabeça e Frequência do batimento flagelar cruzado, independente do tempo de exposição. Houve aumento da fluidez

total nas concentrações de 20 a 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ e fluidez viável em 40 e 80 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ para OEOV e OEOM. Na citometria de fluxo, os parâmetros avaliados não sofreram alterações significativas na concentração de 20 a 40 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de OEOV nas 24hs de exposição, havendo para OEOM, alterações significativas à partir da concentração de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, em 0 e 24 horas. As alterações provocadas pelas concentrações maiores dos óleos sugerem toxicidade, assim como evidenciam os possíveis mecanismos de ação a serem explorados para aplicação farmacológica dos óleos da família Lamiaceae, em especial *Origanum vulgare*.

Palavras-chave: *Pseudomonas aeruginosa*; CASA; citometria de fluxo; Família Lamiaceae; sinergismo.

Abstract

GUTERRES, Karina Affeldt. “**Perfil de resistência de *Pseudomonas* spp. isoladas de cães e ação antibacteriana e toxicidade de óleos essenciais de plantas da família Lamiaceae**”. 2019. 97f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

Dermatological conditions are of great importance in small animals, especially *Pseudomonas* infections, which are resistant to most antimicrobials used in medical practice. Bacterial resistance is a source of concern, increasing research in search of new therapeutic options, such as medicinal plants, including the Family Lamiaceae. The objective of this study was to verify the *Pseudomonas aeruginosa* casuistry in samples of dog otitis received by the Regional Diagnostic Laboratory (LRD), to determine its resistance profile to antimicrobials and to the essential oils of *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* and *Rosmarinus officinalis*, to evaluate a possible synergism of the oils with antimicrobial agents, as well as to determine the chemical composition of the oils and the cytotoxicity of these oils in MDBK cells and in spermatozoa through the CASA and flow cytometry methods. For the study of the sample of otitis registered in the LRD, all the records from 2010 to 2018 of dogs were evaluated, and those with *P. aeruginosa* isolation were selected. The essential oils used in the study were obtained by steam distillation and were tested at concentrations of 250µg / mL⁻¹. For the antibiogram 13 drugs were used, and for the evaluation of the susceptibility of *Pseudomonas* spp. essential oils and the association of antimicrobials with oils, the disc diffusion method (Kirby-Bauer, 1966) was used. To evaluate cytotoxicity, renal cells (MDBK) and sperm cells were used, and the toxicity of MBDK was evaluated by MTT and spermatozoa by CASA and flow cytometry. *P. aeruginosa* was present in 11% of the canine otitis samples received between 2010 and 2018 in the LRD. Canine isolates of *Pseudomonas* spp. presented a high rate of multiresistance (46.7%) to antimicrobials, especially Beta-lactams, being sensitive for Quinolones, Gentamycin and Imipenem. The essential oils inhibited *Pseudomonas* spp., Forming larger inhibition halos for OERO followed by OEOM and OEOV. When evaluating the essential oils with antimicrobials, synergism was observed in 90% of the associations. OEOV and OEOM presented the majority composition of Gamma-Terpinene, 4-Terpineol and Alpha-Terpinene, while in OERO they stood out Cineole, Alpha-Pinene and Camphor. All oils showed high cytotoxicity from 0.24 µg / mL⁻¹ to MDBK, OERO being the most cytotoxic. At CASA, increased sperm cell motility at concentrations of 20µg / mL⁻¹ and 40µg / mL⁻¹ at 0 and 24 hours of OEOV exposure was observed, with a reduction of 160µg / mL⁻¹. OEOM at the concentration of 20 µg / mL⁻¹ did not alter MT and MP, mean distance traveled, amplitude of the lateral displacement of the head and frequency of the crossed flagellar beat, regardless of the time of exposure. There was an increase in total fluidity at concentrations of 20 to 40 µg / mL⁻¹ and viability at 40 and 80 µg / mL for OEOV and OEOM. In the flow cytometry, the parameters evaluated did not undergo significant changes in the OEOV concentration of 20 to 40 µg / mL⁻¹ in the 24 hours of exposure, with OEOM, significant changes from the concentration of 40 µg / mL, in 0 and 24 hours. The changes caused by the higher concentrations of the oils suggest toxicity, as well as evidence the possible mechanisms of action to be

explored for the pharmacological application of the oils of the family Lamiaceae, especially *Origanum vulgare*.

Key-words: *Pseudomonas aeruginosa*; CASA; flow cytometry; Lamiaceae family; synergism.

Lista de Figuras

Artigo 1

Figura 1 Média dos halos de inibição dos óleos essenciais, antimicrobianos e das associações de OEOV, OEOM e OERO com antimicrobianos nos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. CIP – Ciprofloxacina, IMI- Imipenem, GEN- Gentamicina, ENO- Enrofloxacina, CRO- Ceftriaxona, SUT- Sulfametoxazol + trimetoprim. CFL- Cefalotina, AMP- Ampicilina, OXA- Oxacilina, AMC- Amoxicilina + clavulanato, CFX- Cefalexina, AMI – Amicacina, NEO- Neomicina.....50

Lista de Tabelas

Artigo 1

Tabela 1 Médias dos halos de inibição (mm) dos antibióticos testados em isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> provenientes de cães.....	46
Tabela 2 - Isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e susceptibilidade individual frente aos grupos de antimicrobianos testados.....	47
Tabela 3 Média e desvio padrão dos óleos essenciais da família Lamiaceae utilizados nos isolados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	48
Tabela 4 Resultados dos maiores halos médios de inibição (mm) provenientes da associação dos antibióticos com os óleos essenciais em isolados de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49

Artigo 2

Tabela 1 Isolamento de <i>Pseudomonas</i> spp. das amostras de otite em cães, recebidas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas, no período de agosto de 2009 a agosto de 2019.....	54
Tabela 2 Isolados clínicos de <i>Pseudomonas</i> spp. e susceptibilidade frente aos diferentes grupos de antimicrobianos testados.....	55

Artigo 3

Tabela 1 Compostos químicos identificados nos óleos essenciais de <i>Origanum vulgare</i> , <i>Origanum majorana</i> e <i>Rosmarinus officinalis</i> por Cromatografia (GC).....	76
Tabela 2 Citotoxicidade em células MDBK dos óleos essenciais de <i>O. vulgare</i> , <i>R. officinalis</i> e <i>O. majorana</i> , na maior ($250\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) e menor ($0,24\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) concentração testada.....	77
Tabela 3 Média dos parâmetros de motilidade, distância, amplitude de deslocamento e batimento flagelar das células espermáticas submetidas a diferentes	

concentrações do óleo essencial de <i>Origanum vulgare</i> nos tempos de exposição 0 e 24 horas.....	78
Tabela 4 Média dos parâmetros de motilidade, distância, amplitude de deslocamento e batimento flagelar das células espermáticas submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Origanum majorana</i> nos tempos de exposição 0 e 24 horas.....	79
Tabela 5 Resultados obtidos a partir da avaliação espermática por citometria de fluxo com diferentes concentrações de óleo essencial de <i>O. vulgare</i> , no tempo 0 e 24horas.....	80
Tabela 6 Resultados obtidos a partir da avaliação espermática por citometria de fluxo com diferentes concentrações de óleo essencial de <i>O. majorana</i> , no tempo 0 e 24 horas.....	81

Lista de Abreviaturas

Å	Ångström
µL	Microlitro
ABTS	2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)
ALH	Amplitude do deslocamento lateral da cabeça
AMC	Amoxicilina + Clavulanato
AMI	Amicacina
AMP	Ampicilina
ANOVA	Análise de variância
ANR	Acrossoma Não Reagido
AprA	Protease alcalina
ATP	Adenosina trifosfato
BCF	Frequência do batimento flagelar cruzado
CASA	Sistema computadorizado de análise de sêmen
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEEA	Comissão de Ética em Experimentação Animal
CFX	Cefalexina
CFL	Cefalotina
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CIP	Ciprofloxacina
CRO	Ceftriaxona
DAP	Distância média percorrida
DCL	Distância curvilínea
DFI	Índice de fragmentação de DNA
DSL	Distância linear

ENO	Enrofloxacina
F	Fluidez
FaVET	Faculdade de Veterinária
G-	Gram negativo
G+	Gram positivo
GEN	Gentamicina
HMI	Halo Médio de Inibição
I	Intermediário
IM	Integridade de Membrana
IMI	Imipenem
LABVIR	Laboratório de Virologia
LasA	ElastaseA
LasB	Elastase B
LIN	Linearidade
LPO	Lipoperoxidação
LRD	Laboratório Regional de Diagnóstico
MDBK	Madin-Darby bovine kidney
MEM	Meio essencial mínimo
MP	Motilidade progressiva
MT	Motilidade total
MTT	3 – (4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NEO	Neomicina
OE	Óleos essenciais
OEOM	Óleo essencial de <i>O. majorana</i>
OEOV	Óleo essencial de <i>O. vulgare</i>
OERO	Óleo essencial de <i>R. officinalis</i>
O. MAJORANA	<i>Origanum majorana</i>

O. VULGARE	<i>Origanum vulgare</i>
OXA	Oxacilina
P. AERUGINOSA	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
PLP's	Proteínas ligadoras de penicilina
R	Resistente
R. OFFICINALIS	<i>Rosmarinus officinalis</i>
S. AUREUS	<i>Staphylococcus aureus</i>
SPP	Espécies
STR	Retilinearidade
SUT	Sulfametoxazol + Trimetoprim
S	Sensível
TG	Tris-gema
UFPeI	Universidade Federal de Pelotas
UTI	Unidade de Terapia Intensiva
VAP	Velocidade média da trajetória
WOB	Oscilação

Sumário

1 Introdução.....	15
1.1 Importância bacteriana nas enfermidades tegumentares em cães..	15
2 Objetivos.....	18
2.1 Objetivo geral.....	18
2.2 Objetivos específicos.....	18
3 Revisão de Literatura.....	19
3.1 Antibacterianos utilizados na dermatologia Veterinária e indicados contra <i>Pseudomonas</i> spp.....	19
3.2 Gênero <i>Pseudomonas</i> e fatores de patogenicidade e resistência.	22
3.3 Perspectivas do uso de plantas da família Lamiaceae em microrganismos resistentes.....	25
3.3.1 <i>Origanum vulgare</i> L.....	26
3.3.2. <i>Origanum majorana</i> L.....	28
3.3.3 <i>Rosmarinus officinalis</i> L.....	29
3.4 Avaliação de citotoxicidade de plantas medicinais.....	30
4.1 Artigo 1 – Susceptibilidade de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, isoladas de lesões cutâneas de cães, a antimicrobianos, óleos essenciais e associações.....	33
4.2 Artigo 2 – Ocorrência de otite canina por <i>Pseudomonas</i> spp. e sensibilidade dos isolados registrados no laboratório regional de diagnóstico no período de dez anos	51
4.3 Artigo 3 –Toxicidade celular e espermática de óleos essenciais da família Lamiaceae.....	60
5 Considerações finais.....	82
Referências.....	83

1 Introdução

1.1 Importância bacteriana nas enfermidades tegumentares em cães

As afecções do sistema tegumentar possuem grande importância para os animais de companhia, representando cerca de 30 a 40% dos casos presenciados na clínica médica (MOTTIN, 2008; MATOS et al., 2012). As principais dermatopatias de cães e gatos são de etiologia bacteriana, sendo a instituição de uma terapia adequada nestes quadros, prejudicada quando o antibiótico de primeira escolha não é eficaz, tornando esta escolha 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).

Segundo ARIAS et al. (2008), os bacilos Gram negativos estão dentre os principais microrganismos envolvidos nas dermatopatias de cães, chegando a 70% do isolamento em 18 pacientes com ferimentos cutâneos de origem traumática, com predominância do gênero *Pseudomonas*, seguido por *Proteus*. Dentre os Gram positivos, destacaram-se os gêneros *Staphylococcus* e *Streptococcus* isolados com igual frequência (ARIAS et al., 2008). Entretanto, é comum a ocorrência de vários microrganismos em ferimentos cutâneos, destacando-se *Pseudomonas* spp, *Streptococcus* spp. e *Staphylococcus* spp. (AMALSADVALA & SWAIM, 2006), sendo que, os mesmos gêneros bacterianos têm sido isolados com frequência nas otites em cães, com *Staphylococcus intermedius* e *Pseudomonas aeruginosa* predominando (OLIVEIRA, 2005). Segundo SANTOS et al. (2005), *Pseudomonas* spp. vem se destacando, devido a resistência frente aos antimicrobianos, assim como, devido ao grande potencial de virulência (KRUTH, 2006). Considera-se que a terapia, quando esta bactéria está presente, torna-se complicada, devido à ocorrência de resistência natural e adquirida, sendo a gentamicina, amicacina e a

ciprofloxacina potencialmente eficientes contra este agente, enquanto que a enrofloxacinina é ineficaz em muitos casos (KRUTH, 2006).

Segundo OLIVEIRA et al. (2005), nos cães otopatas, *Pseudomonas aeruginosa* foi resistente à maioria dos antibióticos testados. ARIAS et al., (2008), cita baixa suscetibilidade das bactérias de tegumento cutâneo aos antimicrobianos, enfatizando a obrigatoriedade de antibiogramas em amostras de animais com ferimentos infectados. Dentre os microrganismos Gram negativos isolados, o gênero *Pseudomonas*, foi resistente a 14 antibióticos testados, sendo que nenhum antibiótico apresentou eficácia maior do que 50% (ARIAS et al., 2008).

A resistência aos antimicrobianos é inerente às bactérias, sendo causada basicamente pela evolução destes microrganismos, 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 paciente (AGOSTINIS et al., 2012). Segundo Vieira (2012), na 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.

Diante desta problemática de resistência por parte dos microrganismos aos antibióticos utilizados, 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 assim aquelas utilizando extratos vegetais com fins profiláticos e curativos em infecções bacterianas (PORTE & GODOY, 2001; HAIDA et al., 2007; CLEFF, 2008; SILVA, 2011; SANTIN, 2013; GIORDANI, 2013).

Os extratos de plantas da família Lamiaceae, como os óleos essenciais, 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; MATOS, 2014). Quando se refere à atividade antimicrobiana, destaca-se *Origanum vulgare*, *Origanum*

majorana e *Rosmarinus officinalis* (CLEFF, 2008; SANTIN, 2013; MATOS, 2014), sendo que em algumas espécies vegetais pertencentes à esta família, o uso popular está tradicionalmente consolidado no tratamento de diversas infecções e serve como guia para pesquisas farmacológicas (MICHELIN et al., 2005).

2 Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Isolar e definir o perfil de resistência em *Pseudomonas* spp. isoladas de lesões cutâneas de animais, determinando a sensibilidade destas aos óleos essenciais da família Lamiaceae, assim como a associação dos óleos com antimicrobianos, observando a ocorrência deste microrganismo em otites caninas, além de avaliar a toxicidade celular dos óleos.

2.2 Objetivos Específicos

- Isolar e identificar *Pseudomonas* spp. provenientes de lesões cutâneas de caninos e felinos;
- Traçar um perfil de susceptibilidade de *Pseudomonas* spp. isoladas de lesões cutâneas de cães frente a 13 antimicrobianos;
- Avaliar a atividade *in vitro* do óleo essencial de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis* frente à *Pseudomonas* spp. multiresistentes;
- Avaliar a atividade *in vitro* de antimicrobianos e dos óleos essenciais associados aos antimicrobianos em *Pseudomonas* spp.;
- Realizar um levantamento dos casos de otite canina causados por *Pseudomonas* spp., no período de 2010 a 2018, no Laboratório Regional de Diagnóstico – FaVET, UFPEl;
- Identificar os principais compostos químicos dos óleos essenciais utilizados nos testes *in vitro*;
- Avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais da família Lamiaceae em células MDBK;
- Avaliar a toxicidade dos óleos essenciais da família Lamiaceae em células espermáticas de ovinos através do CASA;
- Realizar citometria de fluxo nas células espermáticas com os óleos com menor citotoxicidade.

3 Revisão de Literatura

3.1 Antibacterianos utilizados na dermatologia Veterinária e indicados contra *Pseudomonas* spp.

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

Penicilinas, cefalosporinas, amidinopenicilinas, carbapemênicos, ácido clavulânico, sulbactam e monobactâmicos, entre outros, pertencem aos antibióticos beta-lactâmicos ou beta-lactaminas e constituem um grupo de fármacos com um grupamento químico denominado anel beta-lactâmico (ANDRADE, 2002). Os isolados que apresentam resistência à meticilina ou oxacilina, podem se apresentar sensíveis aos beta-lactâmicos *in vitro*, mas são realmente resistentes a toda esta classe de drogas *in vivo* (MAY, 2006).

Os antibióticos beta-lactâmicos atuam nas bactérias através da ligação com proteínas ligadoras de penicilina (PLP's), que são enzimas catalisadoras da síntese da parede celular da bactéria (MANTESE, 1999, TAVARES, 2000). A resistência ocorre pela alteração das PLP's, o que resulta em uma diminuição da afinidade dessas enzimas a esses antibióticos (TAVARES, 2000). Alguns autores têm 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 apresentam como vantagem maior espectro de ação contra as bactérias Gram negativas e alguns anaeróbios (RODRIGUES et al.

2007). A cefalosporina Ceftriaxona, pertencente à terceira geração, é utilizada em infecções por Gram negativos em pacientes hospitalizados, infecções pós-operatórias deferidas e nas infecções por *Pseudomonas* spp., 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). Na quinta geração de cefalosporinas, destaca-se o ceftobiprole, por apresentar 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, tratando-se de microrganismos beta-lactamases resistentes, como o gênero *Pseudomonas*, algumas cefalosporinas de terceira geração, sobretudo a ceftazidima, que apresentava atividade frente ao gênero, apresenta-se ineficaz atualmente (FERREIRA, 2005).

Outro grupo que se destaca são os aminoglicosídeos que são antibióticos comumente usados em infecções bacterianas por microrganismos Gram negativos aeróbicos (SOUZA et al., 2008; RIBEIRO, 2017). Todos os aminoglicosídeos atuam pelo mesmo mecanismo de ação, ligando-se à fração 30S dos ribossomos inibindo a síntese protéica ou produzindo proteínas defeituosas, causando desta forma alteração na permeabilidade 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 o gênero *Pseudomonas*, sendo as bactérias anaeróbicas mais resistentes ao efeito antibacteriano (COSTA, 1999; RIBEIRO, 2017).

Entretanto, devido ao elevado potencial tóxico dos aminoglicosídeos, o uso destes fármacos fica restrito, podendo aumentar o tempo de hospitalização do paciente quando há intoxicação (OLIVEIRA et al., 2006). Os aminoglicosídeos mais comumente utilizados e conhecidos são: estreptomina, neomicina, amicacina, gentamicina, canamicina, tobramicina, netilmicina, aprimicina e espectinomicina (QUEIROZ, 2008). Os únicos usados em qualquer extensão na clínica veterinária são a amicacina, gentamicina e a neomicina, sendo esta última muito tóxica para se

usada de forma sistêmica, passando a ser utilizada topicamente no tratamento de algumas dermatopatias (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). O principal fármaco representante deste grupo devido ao uso exclusivo em medicina veterinária é a enrofloxacin (SILVA & HOLLENBACH, 2010), que atua, assim como outras fluoroquinolonas, inibindo a atividade catalítica de enzimas responsáveis e essenciais à replicação e transcrição do DNA bacteriano (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).

Ao contrário das quinolonas de primeira geração, a administração clínica das fluoroquinolonas produz mutantes resistentes numa frequência ainda pequena (SILVA & HOLLENBACH, 2010), no entanto, POMBA-FÉRIA et al. (2002) cita a resistência de *Pseudomonas* spp. isoladas de felinos à enrofloxacin. De acordo com OLIVEIRA et al. (2012), isolados Gram negativos, especialmente *P. aeruginosa*, apresentaram maior sensibilidade à norfloxacin, ofloxacin e ciprofloxacin, seguido por enrofloxacin. Clinicamente, a resistência às fluorquinolonas tem sido observada nos casos de subdose ou tempo de tratamento inadequado (VIEIRA, 2012).

Até a década de 1960, dentre os antimicrobianos existentes, *P. aeruginosa* demonstrava-se sensível apenas à ação das polimixinas, sendo reconhecida por sua resistência natural às diferentes classes de antimicrobianos disponíveis (HANCOCK, 1998; FERREIRA, 2005; FERREIRA, 2014). Posteriormente, com a descoberta de novas substâncias antimicrobianas, verificou-se a sensibilidade desta bactéria a alguns aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina, tobramicina e metilmicina), as

carboxipenicilinas e ureidopenicilinas, a algumas cefalosporinas de terceira geração, sobretudo a ceftazidima, as cefalosporinas de quarta geração, aos carbapenemas, como o imipenem, ao aztreonam, a colistina e as fluoroquinolonas, especialmente o ciprofloxacino (HANCOCK, 1998; FERREIRA, 2005; COSTA, 2009). Entretanto, FERREIRA no ano de 2005, já citava a resistência adquirida do microrganismo frente à ceftazidima e gentamicina, fato considerado imprevisível, pois estes antimicrobianos eram inicialmente uma potente arma contra *P. aeruginosa*. A aquisição de resistência neste gênero ocorre com frequência e, dificilmente, encontra-se um tratamento efetivo para infecções por este patógeno, de forma que se consiga impedir o número de mortes de pacientes infectados (COSTA, 2009).

A facilidade de *Pseudomonas* spp. em adquirir resistência, por fenômeno de mutação, conjugação, transposição e indução, tornou a ação dos antimicrobianos obsoleta (FERREIRA, 2005). A existência de genes de resistência intrínsecos, habitualmente confere pequena permeabilidade da parede celular da bactéria à penetração dos fármacos antimicrobianos. Em adição, a aquisição de novos genes de resistência, por exemplo, que determinam a produção de beta-lactamases, que inativam antibióticos beta-lactâmicos através da hidrólise do anel heterocíclico e o mecanismo de efluxo que retira os fármacos do meio intracelular como ocorre com as quinolonas (HANCOCK, 1998; FERREIRA, 2005), fazem de *Pseudomonas* spp. uma bactéria de importante patogenicidade.

3.2 Gênero *Pseudomonas* e fatores de patogenicidade e resistência

O gênero *Pseudomonas* destaca-se como um dos grupos de microrganismos Gram negativos mais frequentemente envolvidos em infecções hospitalares (COSTA, 2009). As bactérias pertencentes a este gênero se apresentam sob a forma de bastonetes isolados ou aos pares, movidos por flagelos polares, Gram negativos aeróbicos e não-fermentadores (MATA & ABEGG, 2007; COSTA, 2009). Em ágar Mac Conkey, não utilizam a lactose, o que facilita a sua identificação posterior, ao diferenciá-las das demais enterobactérias fermentadoras da lactose (FERREIRA, 2005).

Estas bactérias secretam várias toxinas e enzimas que aumentam sua virulência frente ao hospedeiro (FERREIRA, 2005; MATA & ABEGG, 2007). Algumas

cepas, por exemplo, produzem polissacarídeos extracelulares, que podem impedir a fagocitose, prejudicando a difusão de antibióticos e facilitando a colonização pelo patógeno. A toxina A é a mais prejudicial proteína extracelular desta bactéria, produzida por 90% das cepas, tendo a função de bloquear a síntese protéica e causar a destruição tecidual, assim como a exoenzima-S, que inibe a síntese protéica e está envolvida na patogênese. A maioria das cepas também produz um ou mais pigmentos, sendo o mais comum a piocianina, que retarda o crescimento de outras bactérias, facilitando sua proliferação (MATA & ABEGG, 2007). Entre as enzimas que degradam o tecido conjuntivo há três proteases bem caracterizadas: duas elastases (LasA e LasB) que degradam elastina, e uma protease alcalina, que degrada o colágeno, trazendo injúrias aos pacientes (FERREIRA, 2005).

Pseudomonas aeruginosa, pode ser isolada de vários ambientes, sendo considerada um microrganismo saprófito de águas, solos úmidos e vegetais, além de apresentar-se como comensal no intestino, pele e cavidade oral de pessoas e animais saudáveis, apresentando nestes indivíduos, pequena capacidade patogênica (BARBOSA, 2009; MATA & ABEGG, 2007). No entanto, pode representar grande risco septicêmico em indivíduos imunossuprimidos, acompanhados de procedimentos invasivos, queimaduras e feridas operatórias, que se tornam porta de entrada para a bactéria (FERREIRA, 2005; COSTA, 2009). Portadores assintomáticos podem apresentar-se como veículo importante destes patógenos, no ambiente hospitalar, sendo *Pseudomonas* spp. uma bactéria oportunista isolada de uma grande variedade de infecções hospitalares, destacando-se em medicina veterinária nos quadros de otites externa e cistites nos cães, endometrites, ceratites e conjuntivites em eqüinos e mastite em bovinos (ARAIS, 2013), podendo em alguns casos causar septicemia fatal (BARBOSA, 2009; MATA & ABEGG, 2007).

Uma característica marcante das infecções por *P. aeruginosa* adquiridas em UTI humanas é a multiresistência, sendo que nas amostras isoladas nestas unidades de tratamento os percentuais de resistência são os mais elevados, refletindo maior intensidade de uso de antimicrobianos nesse ambiente, e, possivelmente transmissão de isolados multiresistentes entre os pacientes (FERREIRA, 2005).

Vários antibióticos são empregados em infecções ocasionadas por *Pseudomonas* spp., sendo que em medicina humana os carbapenêmicos, como o imipenem, normalmente são os mais eficazes e geralmente empregados como

drogas de reserva no tratamento de infecções por cepas resistentes a outros agentes beta-lactâmicos. Por isto, recomenda-se restringir o uso de carbapenêmicos (SANTOS et al., 2002), pois devido às mutações e seleções naturais relacionadas ao uso excessivo de antibióticos, algumas cepas de *Pseudomonas* spp., tornaram-se potentes produtoras de enzimas beta-lactamases, enzimas que destroem antibióticos, incluindo os carbapenêmicos, convertendo-se em grande ameaça aos pacientes hospitalizados, sendo o imipenem ainda considerado eficaz a todas as cepas de *P. aeruginosa* produtoras de beta-lactamases (FERREIRA, 2005; MATA & ABEGG, 2007; COSTA, 2009).

Entre os animais de companhia, a bactéria é frequentemente isolada de infecções caninas, apresentando grande importância em casos de otite externa e média (ARAIS, 2013), sendo a sua frequência considerada alta, como descrito por OLIVEIRA et al. (2012), que cita isolamento de 8,8% de *Pseudomonas* spp. em otite canina, sendo a bactéria Gram negativa mais prevalente. Além disto, os isolados apresentam-se frequentemente com alta resistência, como descrito por OLIVEIRA et al. (2012), que cita resistência múltipla a três ou mais antimicrobianos em 34,9% dos isolados e a cinco ou mais dos antimicrobianos utilizados em 15,5% dos isolados.

SOUZA et al. (2006) relataram a ocorrência de multiresistência aos antimicrobianos em 135 linhagens de *P. aeruginosa* isoladas de otite canina, sendo que a resistência do microrganismo frente à maioria dos antibióticos utilizados, pode ser atribuída como causa provável da alta frequência de *P. aeruginosa* em casos de otite. OLIVEIRA et al. (2012) cita que os casos de otite são facilitados devido à veiculação hídrica de *P. aeruginosa* para o conduto auditivo, visto que várias afecções em animais por esta bactéria são veiculadas pela água.

P.aeruginosa também é comumente isolada de piodermites caninas, além de infecções de trato urinário, infecções oculares e osteomielites. Em felinos, menos frequentemente que em cães, este agente pode ser isolado de infecções cutâneas, otite externa e infecções urinárias (ARAIS, 2013).

A emergência de resistência de *Pseudomonas* spp. aos agentes antimicrobianos, detectada logo após a introdução de diferentes classes de fármacos nas terapias, está relacionada à pressão seletiva exercida pelo uso intenso e indiscriminado dos medicamentos e a fatores intrínsecos relacionados às bactérias, trazendo preocupação para a área médica em geral (FERREIRA, 2005).

3.3 Perspectivas do uso de plantas da família Lamiaceae em microrganismos resistentes

Desde a introdução do mais antigo antimicrobiano até o mais recente, vem se registrando uma pressão seletiva dos microrganismos causada, principalmente, pelo uso indiscriminado dos mesmos, resultando no desenvolvimento de espécies resistentes. Acresce-se que a multiresistência constitui em uma ameaça à sociedade, particularmente à indústria farmacêutica, que se encontra sem resposta terapêutica (FERRAREZE et. al, 2006).

Infelizmente, com o uso abusivo e indiscriminado de antimicrobianos, a incidência de bactérias como *P. aeruginosa* multiresistentes é crescente e o tratamento clínico destas infecções se torna um desafio para equipe de saúde (FERRAREZE et. al, 2006).

Diante desta problemática de resistência por parte dos microorganismos aos antibióticos utilizados, 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 assim aquelas utilizando extratos vegetais com fins profiláticos e curativos em infecções bacterianas (PORTE & GODOY, 2001; HAIDA et al., 2007; CLEFF, 2008; SILVA, 2011; SANTIN, 2013; GIORDANI, 2013).

Os extratos de plantas da família Lamiaceae, como os óleos essenciais, 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; MATOS, 2014). Quando se refere à atividade antimicrobiana, destaca-se *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis* (CLEFF, 2008; SANTIN, 2013; MATOS, 2014), sendo que em algumas espécies vegetais pertencentes à esta família, o uso popular está tradicionalmente consolidado no tratamento de diversas infecções e serve como guia para pesquisas farmacológicas (MICHELIN et al., 2005).

Os óleos essenciais são originados do metabolismo secundário das plantas, possuindo composição química complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanoides (GONÇALVES et al., 2003; SILVA et al., 2003). Os óleos essenciais constituem os elementos voláteis contidos em muitos órgãos vegetais, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos (OLIVEIRA et al., 2006). Ainda, tem sido estabelecido que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (OLIVEIRA et al., 2006).

A identificação da composição química dos óleos essenciais se constitui em uma etapa essencial, já que a atividade antimicrobiana vem sendo associada à presença de determinadas substâncias, como terpenos por exemplo (PORTO & GODOY, 2001; RIBEIRO, 2011). Além disso, a proporção de cada constituinte químico pode variar, sendo freqüentemente afetada por condições ambientais, podendo assim resultar em atividades citotóxicas e biológicas diferentes, fazendo com que testes de citotoxicidade nas etapas de triagem para utilização de extratos vegetais em estudos biológicos se tornem indispensáveis (BLANK et al., 2016).

Diante do contexto, formas de driblar a resistência bacteriana têm sido investigadas, incluindo a associação de fármacos convencionais com extratos vegetais, o que poderia ampliar o espectro de ação dos antimicrobianos, melhorando desta forma, a eficácia destes em microrganismos resistentes (OLIVEIRA et al., 2006; MACHADO, 2011).

Devido à atual e crescente resistência dos microrganismos, no que se destaca o gênero *Pseudomonas*, em adição à atividade antimicrobiana das plantas citadas, torna-se essencial a busca por novas alternativas terapêuticas que tenham ação antibacteriana, investindo-se desta forma em pesquisas acerca do uso de extratos vegetais, com destaque para aqueles provenientes de plantas da família *Lamiaceae* (SILVA, 2016).

3.3.1 *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; 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 aos gêneros 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 comogaba 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).

3.3.2 *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, triacontano, 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 *Escherichia 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.

3.3.3 *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 *R. officinalis* frente a microrganismos da cavidade oral, sugerem a possibilidade de uso deste extrato como antimicrobiano oral (SILVA et al., 2008). Os extratos etanólicos de *Rosmarinus officinalis*, demonstraram efeito em *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus* e outras bactérias resistentes a vários antibióticos (MRSA), quando avaliados pelo método de difusão em disco (OSKAY & SARI, 2007).

Em comparação aos extratos metanólicos, o óleo essencial de *R. officinalis*, apresentou atividade superior para *Staphylococcus aureus*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumonia*, *Enterococcus faecalis*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* (CELIKTAS et al., 2007).

VEGARA et al., (2011), avaliaram extratos hidroalcolicos de *Rosmarinus officinalis*, *Salvia lavandulifolia* e *Thymus mastichina* em isolados de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo que os resultados mostraram melhor resultado dos extratos sobre os microrganismos, em comparação ao ácido rosmarínico, composto fenólico majoritário encontrado nos extratos, que não foi capaz de inibir as bactérias (VEGARA, 2011).

3.4 Avaliação de citotoxicidade de plantas medicinais

Estudos realizados no Brasil demonstraram que a maioria das pessoas que utilizam plantas medicinais desconhece os seus efeitos colaterais, além de utilizá-las empiricamente, sem orientações profissionais sobre dose ou frequência de administração (OLIVEIRA et al., 2014; GIORDANI et al., 2017).

Para assegurar o uso das plantas e de extratos vegetais, é imprescindível a realização de testes de eficácia, segurança e qualidade, utilizando-se métodos para a obtenção de informações toxicológicas pré-clínicas através de pesquisas *in vitro* e *in vivo* (ZÖLLNER & SCHWARZ, 2013). Os testes *in vitro* constituem a etapa inicial para a determinação do potencial tóxico de um produto vegetal e podem reduzir o número de animais experimentais nas etapas posteriores (BEDNARCZUK et al., 2011).

Apesar das plantas medicinais terem a capacidade de produzir muitas substâncias diferentes, alguns grupos ou substâncias são responsáveis pela atividade terapêutica e/ou tóxica. Sendo desejado que estas substâncias ou extratos

vegetais a serem avaliados em sua atividade biológica apresentem ação em baixas concentrações, a fim de evitar efeitos tóxicos às células ou ao organismo. Dessa maneira, os testes de citotoxicidade são intensivamente utilizados, como uma maneira de se obter concentrações efetivas e com baixa toxicidade (GIORDANI, 2017).

A verificação da citotoxicidade de substâncias pode ser avaliada por metodologias mais ou menos sensíveis, expressando assim, resultados satisfatórios para utilização como triagem em relação a toxicidade de extratos vegetais (GIORDANI, 2017). Sendo que os métodos utilizando o MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazólio) e o vermelho neutro tem sido bastante utilizados para verificação da viabilidade celular (SILVA, 2016).

Sabe-se que a toxicidade celular pode ser avaliada microscopicamente, observando alterações da morfologia celular e confirmada através do método colorimétrico MTT (MOSMANN, 1983). O MTT é o sal tetrazolium que, após clivagem por desidrogenases mitocondriais de células, torna-se insolúvel em água pela formação de cristais de formazan, que são solúveis em solventes orgânicos. Em meio de cultura com células, após adição de Dimetil Sulfóxido (DMSO), o MTT convertido em formazan é solubilizado e pode ser medido por espectrofotometria. Esta reação pode ser expressa em percentual de células vivas de acordo com a absorvância obtendo-se, o percentual da viabilidade celular (SILVA, 2016). As linhagens celulares são derivadas de células tumorais ou de tecidos normais que sofreram transformação *in vitro*, sendo cultivadas em laboratório para os ensaios de toxicidade, devido a estarem adaptadas às condições de cultivo *in vitro*, são de fácil manipulação e propagação (SILVA, 2016).

Recentemente, além dos testes utilizando células de linhagem (rim, fígado e pele), os testes envolvendo células espermáticas estabeleceram-se como um importante método de triagem toxicológica, uma vez que são de fácil obtenção, não necessitando de um grande número de animais doadores e nem de métodos invasivos de coleta (VICENTE-CARRILLO et al., 2015). Além disso, apresentam sensibilidade semelhante àquela demonstrada pelas células somáticas usualmente utilizadas, sem necessitar de longos períodos de cultivo e incubação (VICENTE-CARRILLO et al., 2015). Os espermatozoides são células sensíveis a quaisquer alterações na homeostase, como o desequilíbrio iônico, energético e,

principalmente, na função mitocondrial (VICENTE-CARRILLO et al., 2015), indicando o possível potencial tóxico do produto vegetal testado.

A avaliação da toxicidade em células espermáticas pode ser realizada através de sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA), que fornece informações sobre a cinética espermática. Como método complementar na determinação da alteração ocorrida nas células, pode-se associar a citometria de fluxo, técnica que é bastante empregada na pesquisa de fármacos, onde é possível determinar as propriedades físicas e fluorescência de partículas de células, permitindo a avaliação profunda sob diversos parâmetros, como respiração celular, degradação e dano de DNA, formação de espécies reativas de oxigênio e integridade de membrana, dentre outros (FRITZSCHE & MANDENIUS, 2010; GREEN et al., 2011; HOSSAIN et al., 2011).

Diante da grande utilização das plantas medicinais e do risco de toxicidade, a determinação do potencial antimicrobiano, perfil fitoquímico e tóxico dos extratos vegetais torna-se de grande importância, tendo em vista a aplicabilidade dos resultados (GIORDANI, 2017).

4 Artigos

4.1 Artigo 1

Susceptibilidade de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de lesões cutâneas de cães, a antimicrobianos, óleos essenciais e associações

Será submetido à Revista Semina: Ciências Agrárias

1 **Susceptibilidade de *Pseudomonas aeruginosa*, isoladas de lesões cutâneas de cães, a antimicrobianos,**
2 **óleos essenciais e associações**

3 **Susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa*, isolated from skin lesions of dogs, to antimicrobials,**
4 **essential oils and associations**

5
6 **Highligths:**

7 *Pseudomonas aeruginosa* apresentou alta taxa de multiresistência aos antimicrobianos.

8 Halos de inibição maiores para *R. officinalis* seguido de *O.majorana* e *O.vulgare*.

9 Sinergismo em 90% das associações entre óleos e antimicrobianos.

10
11 **Resumo:** As principais dermatopatias de cães e gatos, são de etiologia bacteriana, destacando-se a espécie
12 *Pseudomonas aeruginosa* e aumentando as dificuldades em relação ao tratamento e controle quando a
13 mesma está presente, devido ao grande potencial de virulência e resistência. Estudos prévios vêm
14 demonstrando potencial antimicrobiano dos extratos vegetais de plantas da família Lamiaceae, incluindo os
15 óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis*, sendo neste trabalho verificada a
16 susceptibilidade de isolados clínicos de *P. aeruginosa*, oriundos de cães, a antimicrobianos e a estes óleos,
17 assim como avaliada a associação destes com antibióticos, através do método de difusão em disco, visando
18 um possível sinergismo. Como resultados, os isolados de *P. aeruginosa* apresentaram alta taxa de
19 multiresistência (46,7%) aos antimicrobianos, em especial aos beta-lactâmicos, sendo sensíveis para
20 quinolonas, gentamicina e imipenem. Todos os óleos essenciais inibiram os isolados, formando halos de
21 inibição maiores para *R. officinalis* seguido de *O.majorana* e *O.vulgare*. Quando os óleos essenciais foram
22 associados aos antimicrobianos observou-se sinergismo em 90% das associações. Assim, os óleos essenciais
23 de plantas da família Lamiaceae, são promissores para sequência de avaliações no tratamento de
24 enfermidades causadas por *P. aeruginosa*, tanto isoladamente como em associações com antibióticos.

25 **Palavras-chave:** Antimicrobianos, Família Lamiaceae, *Pseudomonas aeruginosa*, Resistência, Sinergismo.

26 **Abstract:** The main dermatopathies of dogs and cats are of bacterial etiology, standing out the species
27 *Pseudomonas aeruginosa* and increasing the difficulties in relation to treatment and control when it is
28 present, due to the great potential for virulence and resistance. Previous studies have demonstrated the
29 antimicrobial potential of plant extracts from plants of the Lamiaceae family, including the essential oils of
30 *O. vulgare*, *O. majorana* and *R. officinalis*. antimicrobials and these oils, as well as their association with
31 antibiotics, using the disk diffusion method, aiming at a possible synergism. As a result, *P. aeruginosa*
32 isolates showed a high rate of multiresistance (46.7%) to antimicrobials, especially beta-lactams, being
33 sensitive to quinolones, gentamicin and imipenem. All essential oils inhibited the isolates, forming greater
34 inhibition halos for *R. officinalis* followed by *O.majorana* and *O.vulgare*. When essential oils were
35 combined with antimicrobials, synergism was observed in 90% of the associations. Thus, essential oils from

36 plants of the Lamiaceae family are promising for the sequence of evaluations in the treatment of diseases
37 caused by *P. aeruginosa*, both alone and in association with antibiotics.

38 **Key words:** Antimicrobials, Lamiaceae Family, *Pseudomonas aeruginosa*, Resistance, Synergism.

39

40

Introdução

41

42 As afecções do sistema tegumentar possuem grande importância para os animais de companhia,
43 representando cerca de 30 a 40% dos casos presenciados na clínica médica (MOTTIN, 2008; MATOS et al.,
44 2012). Segundo MATOS et al. (2012), as principais dermatopatias de cães e gatos, são de etiologia
45 bacteriana, destacando-se o gênero *Pseudomonas* dentre os isolados Gram negativos (KRUTH, 2006).

46 Dentre as opções terapêuticas, os antimicrobianos do grupo beta- lactâmicos são considerados como
47 primeira opção para a terapia das dermatopatias em cães (PAVLETIC & TROUT, 2006). Entretanto, a
48 emergência da resistência antimicrobiana tem sido amplamente descrita (MEIRELES, 2008; COLARES et
49 al., 2016), sendo que aumentam as dificuldades em relação ao tratamento e controle quando *Pseudomonas*
50 *aeruginosa* está presente, devido ao grande potencial de virulência e ocorrência de resistência natural e
51 adquirida, sendo a terapia considerada extremamente difícil e complicada (FERRAREZE et al., 2007;
52 COLARES et al., 2016; SILVA et al., 2016).

53 A resistência bacteriana aos antimicrobianos é fonte de preocupação para a medicina humana e
54 veterinária, sendo o uso impróprio e abusivo dos antibióticos uma das principais causas do surgimento e
55 seleção de bactérias resistentes, que vem se disseminando mundialmente (MEIRELES, 2008), tornando-se
56 um problema de saúde pública (MOTA et al., 2006). Diante deste contexto, vem sendo estimulada a busca
57 por novas moléculas com atividade antibacteriana (GIORDANI, 2013) e formas de driblar a resistência
58 bacteriana têm sido investigadas, incluindo a associação de fármacos convencionais com extratos vegetais, o
59 que poderia ampliar o espectro de ação dos antimicrobianos, melhorando desta forma, a eficácia terapêutica
60 destes em microrganismos resistentes (OLIVEIRA et al., 2006; MACHADO, 2011).

61 Estudos prévios vêm demonstrando potencial antimicrobiano dos extratos vegetais de plantas da
62 família Lamiaceae (WALLER et al., 2018), incluindo os óleos essenciais das espécies *Origanum vulgare*,
63 *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis* (CLEFF, 2008; SANTIN, 2013; MATOS, 2014; WALLER et
64 al., 2017). Ainda, considerando a atual e crescente resistência bacteriana, na medicina humana e veterinária,
65 no que se destaca o gênero *Pseudomonas*, e que pouco se conhece sobre a eficácia dos óleos essenciais em
66 isolados clínicos provenientes de lesões de caninos, delineou-se o presente trabalho.

67 Desta forma, o objetivo do estudo foi verificar a susceptibilidade de isolados clínicos de *Pseudomonas*
68 *aeruginosa*, a antimicrobianos e aos óleos essenciais de *O. vulgare*, *O. majorana* e *R. officinalis*, assim como
69 avaliar a associação destes com antibióticos, visando um possível sinergismo.

70

71

Materiais e Métodos

Para o estudo foram coletadas secreções de lesões cutâneas de cães utilizando *swab* estéril. Os caninos incluídos foram atendidos no Hospital de Clínicas Veterinária e Ambulatório Veterinário da FaVET – UFPEL (Comitê de Ética da UFPEL, nº. 4389). Todas as amostras foram processadas no Laboratório de Bacteriologia – UFPEL e semeadas em Ágar Sangue ovino 5% e Ágar MacConkey a 37°C por 24hs. Após crescimento bacteriano, estas foram identificadas por macromorfologia e micromorfologia avaliando-se as características de coloração, presença de hemólise e odor, além da observação de cocos ou bastonetes e coloração através da técnica de Gram. A partir do crescimento, os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram selecionados, sendo a identificação do gênero e espécie bacteriana realizada através de provas bioquímicas, com alguns isolados confirmados pelo método automatizado Vitek® 2 GN para microrganismos Gram negativos.

Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram avaliados quanto à resistência a antimicrobianos pelo método de difusão com disco (KIRBY-BAUER, 1966). O meio utilizado foi Ágar Mueller-Hinton e os halos de inibição foram medidos em mm e padronizados pelo CLSI (2019). Os antibióticos utilizados para o antibiograma foram ampicilina (AMP 10 mcg), amoxicilina com clavulanato (AMC 20/10 mcg), amicacina (AMI 30 mcg), cefalexina (CFX 30 mcg), ceftriaxona (CRO 30 mcg), cefalotina (CFL 30 mcg) enrofloxacina (ENO 5 mcg), ciprofloxacina (CIP 5 mcg), neomicina (NEO 30 mcg), gentamicina (GEN 10 mcg), oxacilina (OXA 1 mcg), imipenem (IMI 10 mcg) e sulfametoxazol associado com trimetoprim (SUT 25 mcg).

Origanum vulgare (OV), *Origanum majorana* (OM) e *Rosmarinus officinalis* (RO) utilizados no estudo foram obtidos de forma comercial (Luar Sul – Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Ltda. - Santa Cruz do Sul, RS, Brasil) acompanhados de laudos de certificação. O extrato utilizado das plantas foi o óleo essencial, obtido através da submissão das folhas secas à extração com arraste de vapor em aparelho Clevenger (Farmacopéia Brasileira IV). Na sequência, o óleo obtido de cada planta foi seco com sulfato de sódio anidro p.a, armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração até a utilização.

A técnica de KIRBY-BAUER (1966) foi utilizada para avaliar a susceptibilidade dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* aos óleos essenciais (OE) e para avaliar a associação dos antimicrobianos com os óleos (OLIVEIRA et al., 2006). Os mesmos discos de antibióticos utilizados para o antibiograma dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram avaliados nesta fase, sendo utilizados 20 µL dos óleos essenciais (OEOV, OEOM, OERO) na concentração de 250 µg/mL sobre os mesmos e em discos de papel filtro distribuídos no meio sólido (OLIVEIRA et al., 2006). A concentração utilizada foi estabelecida de acordo com testes preliminares utilizando CIM (Concentração Inibitória Mínima) e CBM (Concentração Bactericida Mínima).

A análise estatística foi realizada com o programa Statistix 9.0, pela metodologia da análise de variância (ANOVA), sendo a comparação das médias dos halos de inibição feitas pelo teste de Tukey.

Resultados e Discussão

109

110 Durante o período experimental, foram obtidos 13 isolados pertencentes ao gênero *Pseudomonas*,
111 espécie *Pseudomonas aeruginosa*, do tegumento de cães com lesões. De acordo com a literatura a bactéria é
112 frequentemente isolada de infecções caninas, apresentando grande importância em quadros de piodermites,
113 otite externa e média, além de infecções de trato urinário, infecções oculares e osteomielites (ARAI, 2013),
114 sendo a sua frequência e resistência aos antibióticos consideradas elevadas, como descrito por OLIVEIRA et
115 al. (2012).

116 Quanto à avaliação da sensibilidade de *Pseudomonas aeruginosa* por antibiograma, observou-se
117 percentual de resistência de 100% frente à Amoxicilina+Clavulanato, Cefalotina, Cefalexina e Oxacilina.
118 Quanto aos outros fármacos, a resistência foi maior para Ampicilina (84,6%) seguido de
119 Sulfametoxazol+Trimetoprim (69,7%), e com menor proporção para Amicacina (15,4%), Ceftriaxona
120 (15,4%) e Neomicina (7,7%). Observou-se resistência intermediária de um isolado quando utilizados
121 Ceftriaxona, Neomicina e Sulfametoxazol+Trimetoprim. Os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* foram
122 sensíveis a Enrofloxacin, Gentamicina, Imipenem e Ciprofloxacina com os maiores halos de inibição
123 (Tabela 1).

124 Todos os isolados do gênero *Pseudomonas* apresentaram algum grau de resistência *in vitro* frente aos
125 antimicrobianos, sendo que no geral o índice de resistência ficou entre 30,8% e 61,15% e a taxa de
126 multirresistência ficou em 46,74% (Tabela 2), resultados semelhantes ao documentado em outras pesquisas
127 (SOUZA et al. 2006; ARAI, 2013; OLIVEIRA et al. 2012). Além da propriedade de transferência de genes
128 de resistência por *Pseudomonas aeruginosa* (MELLO, 2014), estas secretam várias toxinas, enzimas,
129 proteínas, polissacarídeos extracelulares e pigmentos, que aumentam sua virulência frente ao hospedeiro,
130 dificultando a fagocitose, difusão de antibióticos, interferência na síntese proteica, ocorrência de lesão
131 tecidual, além de retardar o crescimento de outras bactérias, facilitando sua proliferação (FERREIRA, 2005;
132 MATA & ABEGG, 2007; SILVA et al., 2016).

133 Em relação aos grupos de antimicrobianos, dentre os beta-lactâmicos, o Imipenem foi o fármaco com
134 maior halo de inibição (29.385 mm), seguido de Ceftriaxona (19.846 mm), enquanto os demais formaram
135 halos pouco expressivos como Amoxicilina+Clavulanato (3.9231 mm) e Ampicilina (2.5385 mm), ou não
136 formaram halo como Cefalotina, Cefalexina e Oxacilina. Houve diferença estatística ($p < 0,05$) de imipenem
137 para ceftriaxona e os demais beta-lactâmicos, que não apresentaram diferença estatística entre si.

138 Ampicilina e Amoxicilina+clavulanato são fármacos utilizados na rotina em medicina veterinária,
139 em especial para infecções ocasionadas por bactérias Gram negativas (KOHL et al., 2016), porém neste
140 estudo esses antibióticos apresentaram baixo desempenho, concordando com CRUZ et al. (2012), que citam
141 um aumento drástico da resistência a estes antimicrobianos nos últimos anos, em decorrência da ampla
142 utilização terapêutica, muitas vezes de forma inadequada. Já a resistência observada para Cefalotina e
143 Cefalexina, pode ter ocorrido devido a estas serem cefalosporinas de 1ª geração com maior espectro de ação
144 para bactérias Gram positivas (RODRIGUES et al., 2007), enquanto que para ceftriaxona o percentual de
145 resistência foi de 15,4%, sendo esta uma cefalosporina de 3ª geração com espectro ampliado para bactérias
146 Gram negativas (RODRIGUES et al., 2007). Estes resultados são preocupantes, já que as cefalosporinas são

147 frequentemente empregadas no tratamento de piodermites na clínica veterinária, sendo a cefalexina
148 considerada como primeira escolha (RODRIGUES et al., 2007).

149 Com relação à oxacilina esta não apresentou atividade nos isolados testados (100% de resistência), o
150 que traz uma grande preocupação para a área médica e veterinária, visto que este antimicrobiano é utilizado
151 no tratamento de enfermidades oriundas de microrganismos produtores de beta-lactamases (MAY, 2006),
152 incluindo o gênero *Pseudomonas* (COSTA, 1999). Assim como, bactérias resistentes a oxacilina podem
153 apresentar o gene MEC-A que confere resistência destas a todo grupo beta-lactâmico (SILVA, 2016).

154 Em relação aos aminoglicosídeos, o maior halo de inibição foi observado para Amicacina (27.615
155 mm), seguido de Gentamicina (26.077 mm) e Neomicina (19.923 mm), porém sem diferença estatística entre
156 estes. Na avaliação das Fluoroquinolonas, o melhor desempenho foi de Ciprofloxacina (36.385 mm)
157 diferindo estatisticamente ($p < 0,05$) de Enrofloxacin (26.462 mm). Ciprofloxacina, enrofloxacin,
158 gentamicina e imipenem apresentaram alta atividade nos isolados deste estudo, corroborando com
159 HANCOCK (1998), FERREIRA (2005) e COSTA (2009), que citam estes antimicrobianos como de escolha
160 no tratamento de enfermidades causadas por *Pseudomonas* spp. Esta alta atividade provavelmente ocorre
161 pela menor utilização destes fármacos nas dermatopatias em cães, principalmente no que se refere à
162 imipenem, de uso hospitalar (GALES et al., 2016), enquanto que gentamicina não é comumente utilizada de
163 forma sistêmica para enfermidades cutâneas em cães devido à toxicidade, sendo reservada para formulações
164 tópicas de uso otológico (ALMENARA et al., 2008). Enrofloxacin apesar de ser prescrita com frequência,
165 ainda apresenta atividade de acordo com OLIVEIRA et al. (2012), em isolados Gram negativos,
166 especialmente *P. aeruginosa*, assim como norfloxacina, ofloxacina e ciprofloxacina, sendo clinicamente, a
167 resistência às fluorquinolonas observada nos casos de subdose ou tempo de tratamento inadequado (VIEIRA,
168 2012).

169 Em relação aos três óleos utilizados (OEOV, OEOM, OERO) e avaliados nos isolados de
170 *Pseudomonas aeruginosa*, não houve diferença estatística entre os mesmos, porém o maior HMI ocorreu ao
171 se utilizar o óleo essencial de *O. vulgare* (Tabela 3).

172 Os óleos essenciais testados inibiram 84,6% dos isolados de *Pseudomonas aeruginosa*, sendo que
173 apenas um isolado de *Pseudomonas aeruginosa*, não apresentou halo de inibição para nenhum óleo, um
174 isolado não apresentou halo de inibição para OERO e outro isolado não apresentou halo de inibição para
175 OEOM e OERO, evidenciando diferente ação inibitória dos óleos em isolados com multirresistência aos
176 antimicrobianos. Os resultados foram semelhantes ao observado por MACHADO (2011), que obtiveram
177 9,8mm de halo para óleo de *O. majorana*, 5,66mm para *R. officinalis* e de 13,8mm para óleo de *Melaleuca*
178 *alternifolia*.

179 Na avaliação do sinergismo dos antimicrobianos com os óleos essenciais observou-se maior halo de
180 inibição em *Pseudomonas aeruginosa* para a associação ciprofloxacina + OERO, com halo médio de
181 inibição (HMI) de 40.53mm, porém não houve diferença estatística até imipenem + OEOM (HMI:
182 31.92mm), sendo as associações encontradas neste intervalo, consideradas as com os melhores resultados do
183 experimento (Tabela 4).

184 Os antibióticos ampicilina (AMP), cefalexina (CFX), cefalotina (CFL) e oxacilina (OXA) obtiveram o
185 pior desempenho na inibição de *Pseudomonas* spp., entretanto na associação com os óleos houve formação
186 de halos para CFX, CFL e OXA e aumento no HMI para AMP (Figura 1). Os resultados para a associação de
187 CFX com *R. officinalis* (OERO) chamam a atenção, já que cefalexina é considerada como de primeira
188 escolha para tratamento de piodermites em cães e a associação com OERO possibilitou uma melhora no
189 desempenho do fármaco nos isolados testados. OLIVEIRA et al. (2006), destacam a resistência apresentada
190 por *P. aeruginosa* aos antibióticos ampicilina, cefalotina, cefalexina, cloranfenicol e gentamicina,
191 corroborando em parte com este estudo, em que os antibióticos beta-Lactâmicos demonstraram baixa ou
192 nenhuma atividade frente aos isolados. Entretanto, o autor relata a não interferência das associações de óleos
193 testados com antibióticos sobre *P. aeruginosa*, resultado diferente do encontrado em nosso estudo, onde
194 houve aumento dos HMI quando associados os OERO, OEOV e OEOM e antimicrobianos (Figura 1).

195 Na associação de Imipenem (IMI) com OEOV, OEOM e OERO, observou-se aumento nos HMI,
196 IMI+OERO apresentou HMI superior aos demais, incluindo o antibiótico Imipenem isolado, porém não
197 diferiu estatisticamente de IMI+OEOV e IMI+OEOM. Com relação aos óleos associados à Neomicina
198 (NEO), NEO+OERO obteve maior HMI, não diferindo estatisticamente de NEO+OEOV e NEO+ OEOM e
199 Neomicina. A associação de Sulfametoxazol+Trimetoprim (SUT) com OERO obteve o maior HMI, sendo
200 superior ao fármaco isolado e ao OERO, sem diferença estatística entre as demais associações. Todas as
201 associações de OXA com OEOV, OEOM, OERO foram superiores ao antibiótico, entretanto os óleos
202 testados isoladamente resultaram em melhor desempenho do que na forma associada, sugerindo antagonismo
203 nas combinações com oxacilina (Figura 1).

204 Na utilização de Ciprofloxacina, Enrofloxacin, Gentamicina e Amicacina em associações com
205 OEOV, OEOM, OERO houve formação de HMI superiores aos fármacos isolados, sendo que os HMI dos
206 antimicrobianos associados ao OERO foram superiores às demais associações com os fármacos, não
207 havendo diferença estatística nas comparações (Figura 1).

208 Na associação dos antimicrobianos e óleos essenciais houve aumento na média dos halos de inibição
209 para os isolados de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes. Este resultado foi observado em diversas
210 associações, para ciprofloxacina (HMI: 36.38mm) e em Cipro. + OERO (HMI: 40.53 mm), observou-se
211 aumento de 4 mm entre os HMI, na associação de AMP. + OEOV (HMI: 10.385 mm) houve um aumento de
212 HMI de 7.8465 mm, 4 vezes superior a ampicilina isolada (HMI: 2.5385 mm). Os resultados estão de acordo
213 com o observado por OLIVEIRA et al. (2006), utilizando cepas de *P. aeruginosa*, obteve maior halo de
214 inibição, com o óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* associado à Tetraciclina, neste trabalho halos com
215 diâmetro \geq que 2mm em comparação ao antibiótico sozinho, foram considerados como efeito sinérgico.

216 Numa avaliação geral dos resultados, observa-se aumento nos halos de inibição formados nas
217 associações dos treze antibióticos com os três óleos essenciais (OEOV, OEOM e OERO). Em 27 associações
218 (90%), houve aumento de halo de inibição, sendo identificado aumento \geq 2 mm em todas as associações com
219 os antibióticos utilizando o óleo de *R. officinalis* (OERO), sendo as maiores diferenças observadas nas
220 associações deste com Ampicilina (aumento de 4,45 vezes), Amoxicilina + Clavulanato (aumento de 2,47
221 vezes) e Sulfametoxazol + Trimetoprim (aumento de 1,38 vezes). Ao ser utilizado o óleo essencial de *O.*

222 *vulgare* (OEOV) e *O. majorana* (OEOM) observou-se aumento ≥ 2 mm nos HMI em cinco e quatro
223 associações, respectivamente. Estes dados são de extrema importância para a área de microbiologia e
224 terapêutica médica e veterinária, tendo em vista o sinergismo observado com as associações dos óleos, sendo
225 estes antimicrobianos muito utilizados na rotina clínica (Ampicilina, Amoxicilina + Clavulanato e
226 Sulfametoxazol + Trimetoprim), e considerados atualmente ineficazes, principalmente frente às bactérias
227 resistentes do gênero *Pseudomonas* (CRUZ et al., 2012).

228 Em todo o experimento apenas três associações com *O. majorana* (OEOM) apresentaram diminuição
229 de halo (10% das associações), sendo elas OEOM + ENO, OEOM + CRO e OEOM + NEO, sendo porém a
230 diferença menor que 1 mm entre a associação e o antibiótico isolado. Vale ressaltar que não foram citadas as
231 associações dos óleos com os antibióticos Cefalexina, Cefalotina e Oxacilina, pois estes não apresentaram
232 HMI quando utilizados isoladamente, sendo conferidos os resultados na associação à ação isolada dos óleos
233 essenciais.

234 Quando comparadas todas as associações de antibióticos com os óleos essenciais, observa-se as
235 maiores diferenças e conseqüentemente os maiores sinergismos, utilizando OERO que, apresentou os
236 maiores halos médios de inibição quando associado aos treze antimicrobianos, seguido do OEOV quando
237 associado com nove antibióticos e OEOM na associação com quatro antibióticos. Os resultados obtidos estão
238 de acordo com RIBEIRO et al. (2012), que avaliou o óleo essencial de *R. officinalis* associado a antibióticos
239 frente à bactérias, incluindo *Salmonella* spp. e *E. coli*, obtendo o maior sinergismo na associação de
240 ampicilina com o óleo. ZAGO et al. (2009), também demonstrou efeito sinérgico entre óleo essencial de *R.*
241 *officinalis* e antimicrobianos em cepas de *S. aureus* e *E. coli* isoladas de humanos. LUQMAN et al. (2007) ao
242 avaliarem o potencial antimicrobiano de óleo de *R. officinalis* em isolados clínicos resistentes à fármacos,
243 observaram maior atividade frente às bactérias Gram positivas (G+), o que pode ser explicado devido ao tipo
244 de parede celular nas G+, que normalmente não restringe a penetração de moléculas tóxicas. Enquanto a
245 menor atividade nas bactérias Gram negativas (G-) foi atribuída ao sistema de barreira, constituído pela
246 membrana externa da parede bacteriana G- que confere impermeabilidade aos agentes antibacterianos,
247 resultando em maior resistência dessas bactérias aos antibióticos (LAMBERT, 2002).

248 Os resultados obtidos no presente estudo se revestem de importância, quando considerado que o
249 gênero *Pseudomonas* pertence ao grupo de bactérias Gram negativas, e o tratamento de pacientes com este
250 microrganismo tem sido considerado um desafio para a área médica, sendo que houve um sinergismo na
251 associação de OERO com os 13 antimicrobianos utilizados.

252

253 **Conclusão**

254 Os isolados caninos de *Pseudomonas aeruginosa* apresentaram alta taxa de multiresistência (46,7%) aos
255 antimicrobianos, em especial aos beta-lactâmicos, sendo sensíveis para Quinolonas, Gentamicina e
256 Imipenem. Todos os óleos essenciais inibiram os isolados, formando halos de inibição maiores para *R.*
257 *officinalis* seguido de *O. majorana* e *O. vulgare*. Quando os óleos essenciais foram associados aos
258 antimicrobianos observou-se sinergismo em 90% das associações. Assim, os óleos essenciais de plantas da

259 família Lamiaceae, são promissores para sequência de avaliações no tratamento de enfermidades causadas
260 pelo gênero *Pseudomonas*, tanto isoladamente como em associações com antibióticos.

261

262

263 **Referências**

264

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

267

268 ARAIS, L. R. **Resistência aos antimicrobianos, pesquisa de exotoxinas e relação genética de**
269 ***Pseudomonas aeruginosa* isoladas de otite externa e piodermite canina**. 2013. 105f. Tese (Doutorado em
270 Clínica e Reprodução Animal)- Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense,
271 Niterói, 2013.

272

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

275

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

279

280 CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Approved Standard—Eighth Edition.
281 **CLSI document M100**. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.

282

283 COLARES, K.T.; ANDRADE, A.F.; ATHAYDE, L. A. Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa*
284 multirresistente em unidade de tratamento intensivo: uma revisão. **RBAC**. 2016;48(3 supl.1):15-9.

285

286 COSTA, D. M. L. Ototoxicidade dos antibióticos aminoglicosídeos e sistema eferente: comparação entre a
287 administração aguda e crônica com a gentamicina e os efeitos agudos de outros antibióticos. **Revista**
288 **Hospital das Clínicas de Porto Alegre**, 19: 186-196, 1999.

289

290 COSTA, A. C. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *O. vulgare* L. e *Cinnamomum***
291 ***zeylanicum* B. contra bactérias multirresistentes**. 98f. 2009. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e
292 Sintéticos Bioativos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, 2009.

293

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

296

297 FERRAREZE, M.V.G.; LEOPOLDO, V.C.; ANDRADE, D.; SILVA, M.F.I. HAAS, V.J. *Pseudomonas*
298 *aeruginosa* multiresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem? **Acta Paul Enferm**
299 2007;20(1):7-11

300

301 FERREIRA, L. L. **Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. 2005. 114 f.
302 Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária Fundação Oswaldo Cruz.
303 Rio de Janeiro, 2005.

304

305 GALES, A. C.; MENDES, R.; RODRIGUES, J.; SADER, H.S. Comparação das atividades antimicrobianas
306 de meropenem e imipenem/cilastatina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos?
307 **J. Bras. Patol. Med.Lab.** vol.38 no.1 Rio de Janeiro Jan. 2002.

308

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

312

313 HANCOCK, R.E.W. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram
314 negative bacteria. **Clin Infect Dis**, v. 27, p. S93-99, 1998.

315

316 KOHL, T; PONTAROLO, G. H.; PEDRASSANI, D. Resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de
317 amostras de animais atendidos em hospital veterinário. **Saúde Meio Ambiente**. v. 5, n. 2, p. 115-127,
318 jul./dez. 2016.

319

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

322

323 LAMBERT, P. A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram positive bacteria
324 and mycobacteria. **J. Appl. Microbiol.**, Bedford-UK, v. 92, p. 46S-54, 2002.

325

326 LUQMAN, S.; DWIVEDI, G. R.; DAROKAR, M. P.; KALRA, A.; KHANUJA, S. P. Potential of rosemary
327 oil to be used in drug-resistant infections. **Altern Ther Health Med**, St Paul-Minnesota, v. 13, n. 5, p. 54-59,
2007.

328

329 MACHADO, B. F. M. T. **Óleos essenciais: verificação da ação antimicrobiana *in vitro*, na água e sobre a**
330 **microbiota da pele humana**. 2011111 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto
331 de Biociências de Botucatu, 2011.

332

333 MATA, P. T. G.; ABEGG, M. A. **Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas***
334 ***aeruginosa***. Arq Mudi. 2007;11(2):20-25.

335

336 MATOS, C.B., MADRID, I.M.; SANTIN, R.; AZAMBUJA, R.H.; SCHUCH, I.; MEIRELES, M.C.A.;
337 CLEFF, M.B. Dermatite multifatorial em um canino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.6, p.1478-1482,
338 2012.

339

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

342

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

345

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

349

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

354

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

357

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

360

361 OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.;
362 SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a
363 atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal**
364 **of Pharmacognosy** 16(1): 77-82, 2006.

365

- 366 OLIVEIRA, V. B. et al. Etiologia, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e aspectos epidemiológicos na
367 otite canina: estudo retrospectivo de 616 casos **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 33, n. 6, p. 2367-
368 2374, nov./dez. 2012.
- 369
- 370 PAVLETIC, M. M.; TROUT, N. J. Bullet, bite, and burn wounds in dogs and cats. **The Veterinary Clinics**
371 **of North America: Small Animal Practice**, v. 36, n. 4, p. 873-93, 2006 FERRAREZE et. al, 2006.
- 372
- 373 RODRIGUES, P. R.C. et al. O uso das cefalosporinas na clínica de pequenos animais: breve revisão.
374 **Veterinária em foco**, v.4, n.2, p.-143-158, 2007.
- 375
- 376 Ribeiro, D. S.; Melo, D. B.; Guimarães, A. G.; Velozo, E. S. Avaliação do óleo essencial de alecrim
377 (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**,
378 Londrina, v. 33, n. 2, p. 687-696, abr. 2012.
- 379
- 380 SANTIN, R. **Potencial antifúngico e toxicidade de óleos essenciais da família Lamiaceae**. 2013. 104f.
381 Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Federal do Rio Grande
382 do Sul, Porto Alegre, RS, 2013.
- 383
- 384 SILVA, D.A.C.M. **Epidemiologia molecular de estirpes bacterianas multirresistentes: *Acinetobacter***
385 ***baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus***. 2016. 98f. Dissertação (Mestrado em
386 Ciências Farmacêuticas) - Instituto superior de ciências da saúde Egas Moniz, Almada, Portugal, 2016.
- 387
- 388 SILVA, L.C. A.; PESSOA, D.A.N., L.A.; MAIA, R. A.T; MATOS & M.M.S. MACÊDO. Systemic Infection
389 by *Pseudomonas aeruginosa* in a Dog. **Acta Scientiae Veterinariae**. 44(Suppl 1): 164.2016.
- 390
- 391 VIEIRA, J. M. C. **Tratamento da piодermite recidivante em cães e gatos causadas por microrganismos**
392 **multirresistentes**.2012. 44f. Trabalho de conclusão de curso apresentado ao programa de Graduação em
393 Medicina Veterinária da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2012.
- 394
- 395 WALLER, S.B.; CLEFF, M.B.; SERRA, E.F.; SILVA, A.L.; GOMES, A.D.R.; DE MELLO, J.R.B.; DE
396 FARIA, R.O.; MEIRELES, M.C.A.; Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in
397 humane and veterinary medicine, **Microbial Pathogenesis**. 2017 Mar; 104:232-237.
- 398
- 399 WALLER, S. B. et al.. Polar *Origanum vulgare* (Lamiaceae) extracts with antifungal potential against
400 *Sporothrix brasiliensis*. Medical Mycology. 2018 Feb 1;56(2):225-233.
- 401

402 ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; FERNANDES JUNIOR, A. Synergism between
403 essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylooccus aureus* and *Escherichia coli* strains from human
404 infections. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 19, n. 4, p. 828-833, dec. 2009.

405

406

407

408

409

410

411

412

413

414

415

416

417

418

419

420

421

422

423

424

425

426

427

428 Tabela 1- Médias dos halos de inibição (mm) dos antibióticos testados em isolados clínicos de *Pseudomonas*
 429 *aeruginosa* provenientes de cães.

ANTIBIÓTICO	HALO RESISTÊNCIA (mm)	MÉDIA (mm)	% DE RESISTÊNCIA	430 431
Ciprofloxacina	= ou <15	36.385	0	432
Imipenem	= ou <13	29.385	0	433
Amicacina	= ou <17	27.615	15,4	434
Enrofloxacina	= ou <22	26.462	0	435
Gentamicina	= ou <12	26.077	0	436
Neomicina	= ou <12	19.923	7,7	437
Ceftriaxona	= ou <13	19.846	15,4	438
Sulfametoxazol+Trimetoprim	= ou <24	13.846	69,7	439
Amoxicilina+Clavulanato	= ou <17	3.9231	100	440
Ampicilina	= ou <16	2.5385	84,6	441
Oxacilina	= ou <9	0.0000	100	442
Cefalexina	= ou <14	0.0000	100	443
Cefalotina	= ou <14	0.0000	100	444
				445
				446
				447
				448
				449

450 *Halo resistência: Valores em mm (CLSI, 2019) para classificar as bactérias como resistentes ao
 451 fármaco. Média (mm): Valores das médias dos halos formados pelas bactérias frente aos
 452 antimicrobianos.
 453

454
455
456Tabela 2 - Isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* e susceptibilidade individual frente aos grupos de antimicrobianos testados.

ISOLADO	β-lactâmicos	Aminoglicosídeos	Fluoroquinolonas	Sulfonamidas
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	(7 fármacos)	(3 fármacos)	(2 fármacos)	(1 fármaco)
1	5 (R) 2(S)	0 (R) 3 (S)	0(R) 2 (S)	1(R) 0(S)
2	5 (R) 2(S)	2 (R) 1 (S)	0(R) 2 (S)	1(R) 0(S)
6	5 (R) 2(S)	0 (R) 3 (S)	0(R) 2 (S)	0(R) 1(S)
9	5 (R) 2(S)	0 (R) 3 (S)	0(R) 2 (S)	0(R) 1(S)
15	5 (R) 2(S)	0 (R) 3 (S)	0(R) 2 (S)	1(R) 0(S)
16	6 (R) 1(S)	0 (R) 3 (S)	0(R) 2 (S)	1(R) 0(S)
19	6 (R) 1(S)	1 (R) 1 (S) 1(I)	0(R) 2 (S)	1(R) 0(S)
21	4 (R) 3(S)	0 (R) 3 (S)	0(R) 2 (S)	0(R) 1(S)
22	5 (R) 2(S)	0 (R) 3 (S)	0(R) 2 (S)	1(R) 0(S)
25	5 (R) 1(S) 1 (I)	0 (R) 3 (S)	0(R) 2 (S)	0(R) 0(S) 1 (I)
40	5 (R) 2(S)	0 (R) 3 (S)	0(R) 2 (S)	1(R) 0(S)
41	5 (R) 2(S)	0 (R) 3 (S)	0(R) 2 (S)	1(R) 0(S)
42	5 (R) 2(S)	0 (R) 3 (S)	0(R) 2 (S)	1(R) 0(S)

457 *Resistente: R; Sensível: S; Intermediário: I.

458

459

460

461 Tabela 3 - Média e desvio padrão dos óleos essenciais da família Lamiaceae utilizados nos isolados clínicos
 462 de *Pseudomonas aeruginosa*

TRATAMENTO	MÉDIA	SD
OEOM	10.462 ^A	6.1185
OEOV	11.615 ^A	5.2367
OERO	8.615 ^A	6.3185

463 OEOM – Óleo essencial de *O. majorana*, OEOV– Óleo essencial de *O. vulgare*, OERO – Óleo essencial
 464 de *R. officinalis*. A: Letras iguais significam sem diferença estatística.

465

466

467

468 Tabela 4 – Resultados dos maiores halos médios de inibição (mm) provenientes da associação dos
 469 antibióticos com os óleos essenciais em isolados de *Pseudomonas aeruginosa*.

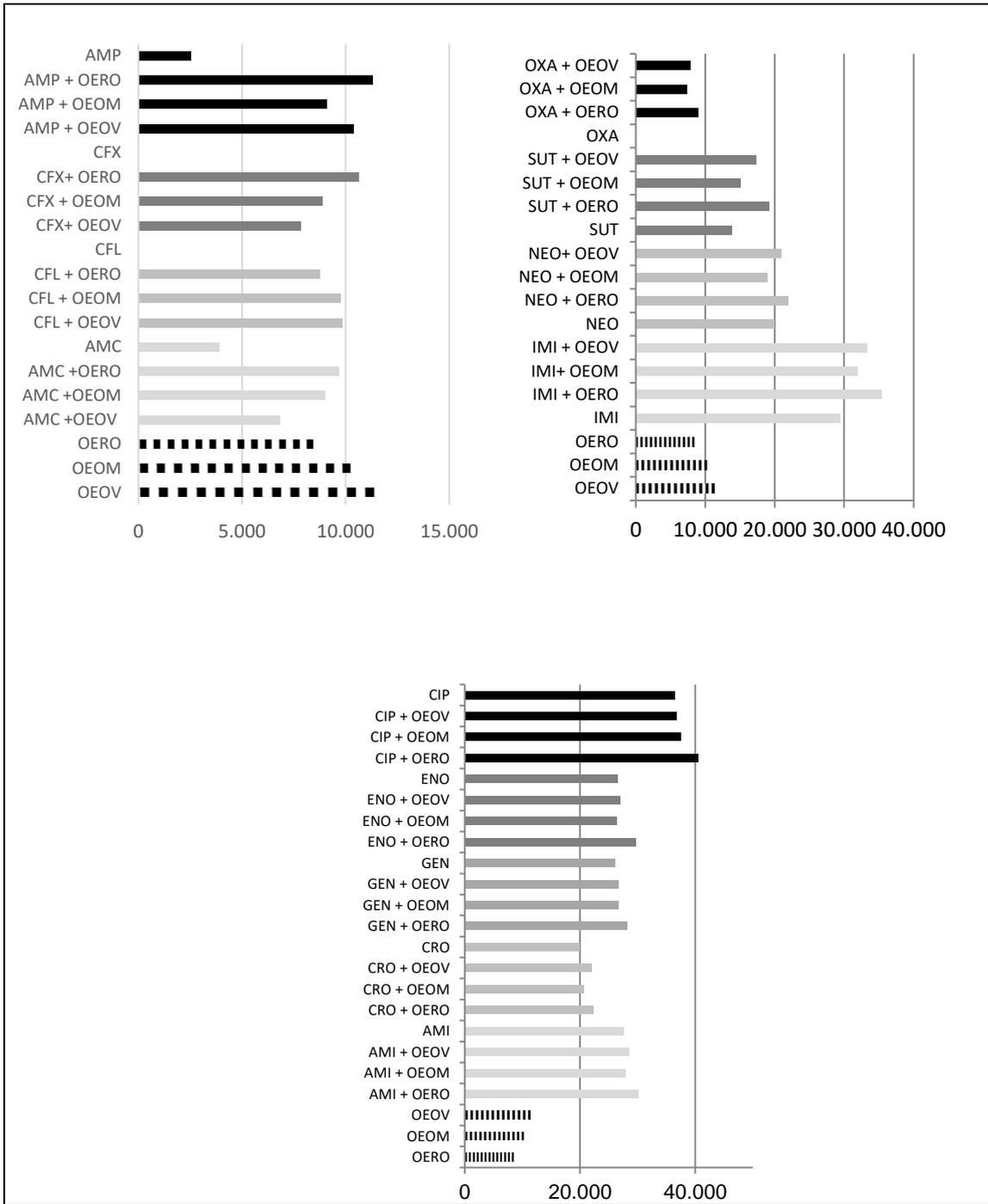
ASSOCIAÇÃO	HMI (mm)	ASSOCIAÇÃO	HMI (mm)	ASSOCIAÇÃO	HMI (mm)
CIP+OERO	40.538 ^A	CRO+ OEOM	20.692 ^{CD}	OXA+ OERO	9.0000 ^F
IMI+OEOM	31.923 ^{AB}	SUT + OERO	19.154 ^E	AMC+ OEOM	9.0000 ^{EF}
GEN+OEOM	26.615 ^{BC}	CFL+ OEOM	9.7692 ^{EF}	CFX+ OEOM	8.8846 ^{EF}
ENO+OEOM	26.308 ^{BC}	AMP+ OEOM	9.0769 ^{EF}		

470 OEOM – Óleo essencial de *O. majorana*, OEOV – Óleo essencial de *O. vulgare*, OERO – Óleo essencial de
 471 *R. officinalis*, CIP – Ciprofloxacina, IMI- Imipenem, GEN- Gentamicina, ENO- Enrofloxacina, CRO-
 472 Ceftriaxona, SUT- Sulfametoxazol + trimetoprim. CFL- Cefalotina, AMP- Ampicilina, OXA- Oxacilina,
 473 AMC- Amoxicilina + clavulanato, CFX- Cefalexina.

474

475

476



477

478 Figura 1- Média dos halos de inibição dos óleos essenciais, antimicrobianos e das associações de OEOV,
 479 OEOM e OERO com antimicrobianos nos isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. CIP –
 480 Ciprofloxacina, IMI- Imipenem, GEN- Gentamicina, ENO- Enrofloxacina, CRO- Ceftriaxona, SUT-
 481 Sulfametoxazol + trimetoprim. CFL- Cefalotina, AMP- Ampicilina, OXA- Oxacilina, AMC- Amoxicilina
 482 + clavulanato, CFX- Cefalexina, AMI – Amicacina, NEO- Neomicina.

4.2 Artigo 2

Ocorrência de otite canina por *Pseudomonas* spp. e sensibilidade dos isolados registrados no laboratório regional de diagnóstico no período de dez anos

Artigo aceito e publicado na Revista Science And Animal Health

V.8 N.1 JAN/ABR 2020 P. 55-64

OCORRÊNCIA DE OTITE CANINA POR *Pseudomonas* spp. E SENSIBILIDADE DOS ISOLADOS REGISTRADOS NO LABORATÓRIO REGIONAL DE DIAGNÓSTICO NO PERÍODO DE DEZ ANOS

GUTERRES, Karina Affeldt ¹;
GONÇALVES, Helena Piúma ²;
CLEFF, Marlete Brum ³;
SILVA, Cristine Cioato da ⁴;
MATOS, Caroline Bohnen de ⁴;
PERERA, Soliane Carra ⁴;
GIORDANI, Claudia ⁵;
LADEIRA, Silvia Leal ⁶.

Recebido: 25/10/2019

Aceito: 05/04/2020

¹Médica Veterinária, Mestre, Professora, Faculdade de Medicina Veterinária/UCS; ²Médica Veterinária, Doutoranda, Programa de Pós-Graduação em Veterinária/UFPEL; ³Médica Veterinária, Doutora, Professora, Departamento de Clínicas Veterinárias/UFPEL; ⁴Médica Veterinária, Mestre, Programa de Pós-Graduação em Veterinária/UFPEL; ⁵Médica Veterinária, Doutora, Professora, Faculdade de Medicina Veterinária/UCS; ⁶Médica Veterinária, Doutora, Laboratório Regional de Diagnóstico, Faculdade de Veterinária/UFPEL.

RESUMO

A otite canina destaca-se na clínica veterinária, sendo que dentre os bacilos Gram-negativos, o gênero *Pseudomonas* apresenta-se como fator complicador no tratamento, caracterizando-se como um grande desafio para os clínicos, em virtude do perfil de multirresistência. Devido à importância clínica, verificaram-se os registros de casos de otite em cães causados pela bactéria, no período de 2009 a 2019, no Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas e o perfil de resistência dos isolados bacterianos. Assim, realizou-se o levantamento da casuística de otites registradas no LRD, sendo incluídas amostras de cães com queixa ou sinais clínicos de otite e selecionadas aquelas com isolamento de *Pseudomonas* spp. Como resultados, *Pseudomonas* spp. esteve presente em 11,7% dos casos, o que está de acordo com dados da literatura que cita uma frequência de 3,4 a 31,6%. A resistência de *Pseudomonas* spp. aos fármacos beta-lactâmicos foi expressiva, com 87% de resistência à amoxicilina com clavulanato, cefalotina, cefalexina e oxacilina, seguido de 84,6% para ampicilina e 15,4% para ceftriaxona. A média de resistência para outros fármacos foi de 73,9% para fluorquinolonas e 52,2% para sulfonamidas e aminoglicosídeos. O estudo destaca a importância da avaliação microbiológica de amostras otológicas, especialmente quando *Pseudomonas* spp. estiver presente, já que o diagnóstico definitivo é fundamental para a implementação de terapia individualizada para os animais, assim como para o controle da resistência bacteriana.

Palavras-chave: Antibióticos. Bactérias. Casuística. Resistência.

INTRODUÇÃO

O gênero *Pseudomonas* é frequentemente isolado de infecções cutâneas em cães e demonstra grande importância em casos de otite externa e média (ARAI, 2013). Segundo a literatura, *Pseudomonas* spp. tem

sido considerada a bactéria Gram-negativa de maior prevalência nas otites caninas, caracterizando-as como uma das infecções otológicas mais desafiadoras em relação à terapia, devido à resistência intrínseca aos antimicrobianos e fácil multiplicação da bactéria no conduto auditivo alterado por inflamações crônicas (NETO; LOPES, 2016; OLIVEIRA et al., 2012).

Desde a introdução dos primeiros antibacterianos até os dias atuais, vem sendo registrado um aumento da população de microrganismos resistentes, causado, entre outros motivos, pela pressão de seleção exercida através do uso inadequado e indiscriminado desses fármacos. Acresce que a multirresistência constitui uma ameaça à saúde pública, somada à incapacidade da indústria farmacêutica em disponibilizar respostas terapêuticas para alguns gêneros bacterianos (COLARES et al., 2016; FERRAREZE et al., 2007). Devido ao uso abusivo de antimicrobianos e outros fatores associados à terapêutica das otites em cães, a incidência de multirresistência em *Pseudomonas* spp. é crescente (SILVA et al., 2016). Também, *Pseudomonas* spp. destaca-se como um dos microrganismos Gram-negativos mais frequentemente envolvidos em infecções hospitalares em humanos (COSTA, 2009), e o tratamento clínico de infecções causadas pelo gênero torna-se um desafio para as equipes de saúde de modo geral, visto o caráter de transmissão interespecíes (FERRAREZE et al., 2007). Ainda, a resistência a múltiplas drogas tem sido observada em isolados de cães, com uma taxa de 34,9% de resistência do gênero *Pseudomonas* a três ou mais fármacos e, de 15,5% a cinco ou mais dos antimicrobianos avaliados (OLIVEIRA et al., 2012). Assim sendo, dada a importância desta bactéria em saúde humana e veterinária, objetivou-se verificar os registros de casos de otite canina causados por *Pseudomonas* spp. no período de dez anos no Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas (FaVet/UFPEL), bem como avaliar o perfil de sensibilidade dos isolados registrados aos antimicrobianos, enfatizando a necessidade da realização dos testes de identificação e susceptibilidade, minimizando os casos de resistência.

MATERIAL E MÉTODOS

Com o interesse de avaliar a ocorrência do gênero *Pseudomonas* em amostras de otite canina encaminhadas para diagnóstico, foi realizado um levantamento nos laudos de exames do LRD da FaVet/UFPEL, através da análise retrospectiva dos laudos emitidos durante o período de dez anos, sendo incluídos dados de agosto de 2009 até agosto de 2019. Foram digitalizados os dados referentes a animais atendidos em clínicas veterinárias da cidade de Pelotas e da região sul do Rio Grande do Sul e do Hospital de Clínicas Veterinárias da FaVet/UFPEL. Os critérios utilizados para inclusão dos dados foram o recebimento de amostras de secreção otológica de cães de ambos os sexos, com queixa ou sinais clínicos de otite, encaminhadas para cultura bacteriana e/ou antibiograma. Foram selecionadas a partir destes, os casos de otite por *Pseudomonas* spp. Os dados referentes a outras espécies bacterianas foram excluídos ou desconsiderados, além dos fatores como tempo de tratamento anterior, medicações prévias ou em andamento, assim como raça e idade. Ainda, foram compilados os dados dos isolados de *Pseudomonas* spp. avaliados quanto à sensibilidade/resistência através da medição (mm) dos halos de inibição de crescimento segundo Bauer (1966), solicitados pelos clínicos veterinários no período do estudo. Nos antibiogramas, foram utilizados os seguintes fármacos: ampicilina (10 mcg), amoxicilina com clavulanato (20/10 mcg), amicacina (30 mcg), cefalexina (30 mcg), ceftriaxona (30 mcg), cefalotina (30 mcg) enrofloxacina (5 mcg), ciprofloxacina (5 mcg), neomicina (30 mcg), gentamicina (10 mcg), oxacilina (1 mcg), imipenem (10 mcg) e sulfametoxazol associado com trimetoprim (25 mcg).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir da análise das fichas do LRD, foram encontrados 4.720 laudos de cães emitidos no período de dez anos, destes, 197 laudos microbiológicos corresponderam a casos de enfermidade otológica, ocasionadas por agentes diversos. No período avaliado, 23 cães apresentaram *Pseudomonas* spp., como agente etiológico de otite, correspondendo a 11,7% (23/197) do total de amostras (Tabela 1).

Tabela 1 – Isolamento de *Pseudomonas* spp. das amostras de otite em cães, recebidas pelo Laboratório Regional de Diagnóstico da Universidade Federal de Pelotas, no período de agosto de 2009 a agosto de 2019.

ANO	CASOS DE OTITE	<i>Pseudomonas</i> spp. (n)	<i>Pseudomonas</i> spp. (%)
2009	2	0	0
2010	5	0	0
2011	21	4	19
2012	10	0	0
2013	5	2	40
2014	5	0	0
2015	25	2	8
2016	23	3	13
2017	49	4	8,2
2018	30	5	16,7
2019	22	3	13,6
TOTAL	197	23	11,7

Ao analisarmos os dados do LRD referentes aos diagnósticos de otite microbiana em cães (n=197) observamos uma média de 19,7 casos/ano. Os resultados encontrados em relação à ocorrência de otite são inferiores à casuística obtida em outros estudos, já que a otite externa canina representa um percentual expressivo dos casos atendidos na prática clínica veterinária no Brasil (GHELLER et al., 2017; OLIVEIRA et al., 2012). Conforme nossa rotina, dados de relatórios de estágio e residência e atendimentos no ambulatório veterinário (MORAES et al., 2014), demonstraram que a otite canina está entre as principais dermatopatias em cães, assim como observado por diversos autores (ARAI, 2013; GHELLER et al., 2017; SILVA et al., 2014). A divergência entre os dados do nosso estudo e a casuística clínica relatada na literatura, pode ser explicada devido ao não encaminhamento de amostras pelos clínicos na região, que optam por tratar empiricamente os pacientes, buscando um diagnóstico de certeza apenas quando não há resposta eficaz frente a terapêutica instituída, prejudicando desta forma a resolução da enfermidade e o registro de dados, o que também está de acordo com outros autores (ARAI, 2013).

Dentre os agentes etiológicos observados nas amostras de otite encaminhadas ao LRD, foram observadas bactérias Gram-positivas, evidenciando-se principalmente o gênero *Staphylococcus*, e bactérias Gram-negativas destacando-se os gêneros *Proteus* e *Pseudomonas*, concordando com a literatura, com ênfase para a espécie *Pseudomonas aeruginosa* nos quadros de otite em cães (GHELLER et al., 2017; MARTINS et al., 2011). Dados da literatura relatam que o isolamento de *P. aeruginosa* ocorre entre 3,4 a 31,6% das amostras clínicas de cães com otite externa (ARAI, 2013), sendo que Oliveira et al. (2005), ao avaliarem 433 cepas isoladas de otite externa em cães, observaram 25% isolados de *P. aeruginosa*, enquanto que Neto e Lopes (2016), ao avaliarem 187 amostras por cultura bacteriana, observaram 47% de predominância de bactérias Gram-negativas e 16% foram identificadas como *P. aeruginosa*. Entretanto, Martins et al. (2011), ao avaliarem o prontuário de 274 cães com otite, atendidos em hospital veterinário, observaram uma ocorrência de 12,89% de *Pseudomonas* spp., resultado próximo aos 11,7% de isolamento observados em nosso estudo.

É notória a emergência de resistência de *Pseudomonas* spp. aos fármacos antimicrobianos presentes nos produtos otológicos (ARAI, 2013), sendo que *P. aeruginosa* tem demonstrado resistência a vários antibióticos amplamente utilizados na medicina veterinária (ARAI, 2013; TUNON et al., 2008). A resistência aos antimicrobianos nos casos de otite está relacionada à pressão seletiva exercida pelo uso intenso e indiscriminado de medicamentos, assim como a fatores intrínsecos relacionados ao conduto auditivo dos pacientes caninos e às bactérias, trazendo preocupação para a área médica em geral (FERREIRA, 2005).

Os isolados de *Pseudomonas* spp. provenientes do LRD no período estudado e avaliados quanto à sensibilidade aos antimicrobianos demonstraram multirresistência a fármacos. Neto e Lopes (2016), ao avaliarem amostras de otites em cães, isolaram diferentes bactérias com perfil de multirresistência, sendo o maior índice observado no gênero *Pseudomonas*, com resistência a três ou mais classes de antibióticos, o que está de acordo com os resultados observados no presente estudo. Ao avaliar os grupos de antibióticos, observou-se alto índice de resistência de *Pseudomonas* spp. aos fármacos beta-lactâmicos, com 87% de resistência frente à amoxicilina com clavulanato, cefalotina, cefalexina e oxacilina, seguido de 84,6% para ampicilina e 15,4% para ceftriaxona. Para outros grupos de fármacos, a média de resistência foi de 52,2% para sulfonamidas e aminoglicosídeos com 15,4% para amicacina e 7,7% para neomicina, enquanto para fluorquinolonas o percentual foi de 73,9% (Tabela 2).

Tabela 2 - Isolados clínicos de *Pseudomonas* spp. e susceptibilidade frente aos diferentes grupos de antimicrobianos testados.

<i>Isolado</i>	Betalactâmicos	Aminoglicosídeos	Fluorquinolonas	Sulfonamidas
1	2 (R) 0 (S)	1 (R) 0 (S)	1 (R) 0 (S)	1 (R) 0 (S)
2	2 (R) 0 (S)	0 (R) 2 (S)	1 (R) 0 (S)	1 (R) 0 (S)
3	1 (R) 0 (S)	0 (R) 1 (S)	0 (R) 2 (S)	0 (R) 0 (S)
4	2 (R) 0 (S)	0 (R) 1 (S)	1 (R) 1 (S)	1 (R) 0 (S)
5	3 (R) 0 (S)	2 (R) 1 (S)	0 (R) 0 (S)	0 (R) 0 (S)
6	0 (R) 1 (S)	0 (R) 2 (S)	0 (R) 2 (S)	0 (R) 0 (S)
7	1 (R) 0 (S)	2 (R) 1 (S)	1 (R) 0 (S)	0 (R) 0 (S)
8	1 (R) 0 (S)	1 (R) 1 (S)	2 (R) 0 (S)	1 (R) 0 (S)
9	4 (R) 0 (S)	0 (R) 3 (S)	1 (R) 0 (S)	1 (R) 0 (S)
10	2 (R) 0 (S)	1 (R) 0 (S)	1 (R) 0 (S)	1 (R) 0 (S)
11	1 (R) 0 (S)	0 (R) 2 (S)	1 (R) 1 (S)	1 (R) 0 (S)
12	2 (R) 2 (S)	0 (R) 2 (S)	2 (R) 0 (S)	1 (R) 0 (S)
13	3 (R) 0 (S)	0 (R) 2 (S)	0 (R) 1 (S)	1 (R) 0 (S)
14	1(R) 1 (S)	0 (R) 2 (S)	0 (R) 2 (S)	0 (R) 0 (S)
	1 (R) 1 (S)	2 (R) 0 (S)	1 (R) 1 (S)	0 (R) 0 (S)

15	2 (R) 1 (S)	0 (R) 2 (S)	0 (R) 2 (S)	0 (R) 0 (S)
17	0 (R) 3 (S)	0 (R) 2 (S)	0 (R) 2 (S)	1 (R) 0 (S)
18	4 (R) 0 (S)	0 (R) 0 (S)	0 (R) 2 (S)	1 (R) 0 (S)
19	2 (R) 0 (S)	0 (R) 2 (S)	1 (R) 1 (S)	0 (R) 0 (S)
20	2 (R) 0 (S)	0 (R) 1 (S)	1 (R) 1 (S)	0 (R) 0 (S)
21	0 (R) 0 (S)	1 (R) 2 (S)	1 (R) 1 (S)	0 (R) 0 (S)
22	2 (R) 0 (S)	1 (R) 1 (S)	1 (R) 1 (S)	1 (R) 0 (S)
23	2 (R) 0 (S)	1 (R) 1 (S)	1 (R) 1 (S)	0 (R) 0 (S)

*R = resistente; S = sensível.

Os índices de resistência de *Pseudomonas* spp. aos antimicrobianos observados neste estudo foram elevados, e reafirmam os relatos de outros autores. Souza et al. (2006) descreveram a multirresistência em 135 linhagens de *Pseudomonas* isoladas de otite em cães. Oliveira et al. (2012) argumentam que os casos de otite podem ser facilitados pela veiculação hídrica de *Pseudomonas* para o conduto auditivo dos animais, o que poderia perpetuar a presença da bactéria. Ainda, *Pseudomonas* tem sido comumente isolada de cães e gatos com piodermites, infecções urinárias, infecções oculares, osteomielites, dentre outras afecções (ARAI, 2013). Em unidades de terapia intensiva de humanos é citada, frequentemente, a transmissão de isolados multirresistentes entre os pacientes, constituindo um grave problema de saúde pública devido às características do gênero, já que *Pseudomonas* spp. produzem várias toxinas e enzimas que aumentam sua virulência frente ao hospedeiro (FERREIRA, 2005; MATA; ABEGG, 2007; SILVA et al., 2016).

Entre os fatores de patogenicidade, citam-se: a secreção de polissacarídeos extracelulares, que interferem na fagocitose, prejudicando a difusão de antibióticos; produção de toxina A por 90% das cepas, uma proteína extracelular envolvida na patogênese da bactéria; além da exoenzima-S, que interfere na síntese proteica e ocasiona lesão tecidual. A produção de proteases por *Pseudomonas* pode contribuir para a ulceração do canal auditivo e a perfuração da membrana timpânica, explicando assim a ocorrência mais comum desta complicação em cães com otite (SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). Ainda, algumas cepas produzem pigmentos, como a piocianina, que retarda o crescimento de outras bactérias, facilitando sua proliferação (MATA; ABEGG, 2007). A produção de enzimas que alteram o tecido conjuntivo, como as elastases (LasA e LasB), que degradam elastina, e uma protease alcalina (AprA) que degrada o colágeno, também têm sido relacionadas à patogenicidade do gênero *Pseudomonas* (FERREIRA, 2005).

Devido a estes diversos fatores, os médicos veterinários devem estar atentos às falhas terapêuticas ocasionadas pelo uso empírico de antimicrobianos (CARDINAL et al., 2015; COLARES et al., 2016). Sendo que o conhecimento da etiologia e o perfil de susceptibilidade das bactérias têm grande importância, principalmente quando houver envolvimento de *Pseudomonas* spp. nas infecções, para assim estabelecer um tratamento específico e eficaz, além de evitar a disseminação de bactérias multirresistentes (TUNON et al., 2008).

CONCLUSÃO

Pseudomonas spp. esteve presente em amostras de otite canina diagnosticadas no LRD da FaVet/UFPEL no período estudado, sendo observados elevados índices de multirresistência, destacando-se os fármacos beta-lactâmicos, fluorquinolonas, sulfonamidas e aminoglicosídeos. Estudos relacionados aos agentes de otites em cães são importantes, já que este é um problema frequente na rotina clínica, e que vem sendo tratado, muitas vezes, de forma empírica e sem a devida avaliação microbiológica das amostras, o que é fundamental para a implementação de terapia individualizada para os animais, assim como para o controle da resistência bacteriana.

OCCURRENCE OF CANINE OTITIS BY *Pseudomonas* spp. AND SENSITIVITY OF THE ISOLATES REGISTERED IN THE REGIONAL DIAGNOSTIC LABORATORY IN A TEN YEAR PERIOD

ABSTRACT

Canine otitis stands out in veterinary clinics, and among the Gram-negative bacilli, the genus *Pseudomonas* presents a complicating agent for the treatment, being a major challenge for clinicians due to its multidrug resistance profile. Due to the clinical importance, the case records of canine otitis caused by the bacterium and the resistance profile of the bacteria from 2009 to 2019 were verified, at the Regional Diagnostic Laboratory (RDL) of the Veterinary Faculty from the Federal University of Pelotas. The survey of cases of otitis registered in RDL was performed, including dog samples with complaints or clinical signs of otitis, and those with isolation of *Pseudomonas* spp. were selected. As results, *Pseudomonas* spp. was present in 11.7% of cases, what is in agreement with the literature data, which cites a frequency of 3.4% to 31.6%. The resistance of *Pseudomonas* spp. for beta-lactam antibiotics was expressive, with 87% of resistance to amoxicillin with clavulanate, cephalothin, cephalexin and oxacillin, followed by 84.6% for ampicillin and 15.4% for ceftriaxone. The average resistance for other drugs was 73.9% for fluoroquinolones and 52.2% for sulfonamides and aminoglycosides. The study highlights the importance of microbiological evaluation of otological samples, especially when *Pseudomonas* spp. is present, since the definitive diagnosis is fundamental for the implementation of individualized therapy for the animal, as well as for the control of bacterial resistance.

Keywords: Antibiotics. Bacteria. Casuistry. Resistance.

OCURRENCIA DE OTITIS CANINA POR *Pseudomonas* spp. Y SENSIBILIDAD DE LOS AISLAMIENTOS REGISTRADOS EN EL LABORATORIO REGIONAL DE DIAGNOSTICO EN UN PERÍODO DE DIEZ AÑOS

RESUMEN

La otitis canina se destaca en la clínica veterinaria, y entre los bacilos Gram-negativos, el género *Pseudomonas* se presenta como un agente complicado del tratamiento, siendo un desafío importante para los clínicos por el perfil de resistencia a múltiples drogas. Debido a la importancia clínica, se

estudiaron los casos de otitis canina causados por la bacteria entre 2009 y 2019, en el Laboratorio Regional de Diagnostico (LRD) de la Facultad de Veterinaria de Universidad Federal de Pelotas y el perfil de resistencia de los aislamientos bacterianos. Así, se realizó el levantamiento de casos de otitis registrados en el LRD, incluidas muestras de perros con signos clínicos de otitis y seleccionando aquellos con aislamiento de *Pseudomonas* spp. Como resultado, *Pseudomonas* spp. estuvo presente en el 11,7% de los casos, lo que está de acuerdo con los datos de la literatura, que cita una frecuencia del 3,4% al 31,6%. La resistencia de *Pseudomonas* spp. a los fármacos betalactámicos fue expresiva, con un 87% de resistencia a la amoxicilina con clavulanato, cefalotina, cefalexina y oxacilina, seguidos de 84,6% para ampicilina y 15,4% para ceftriaxona. La resistencia promedio para otras drogas fue del 73,9% para las fluorquinolonas y del 52,2% para las sulfonamidas y aminoglucósidos. El estudio destaca la importancia de la evaluación microbiológica de muestras otológicas, especialmente cuando *Pseudomonas* spp. es presente, ya que el diagnóstico definitivo es fundamental para la implementación de la terapia individualizada para cada animal, así como para el control de la resistencia bacteriana.

Palabras clave: Antibióticos. Bacterias. Casuística. Resistencia.

REFERÊNCIAS

- ARAI, L. R. **Resistência aos antimicrobianos, pesquisa de exotoxinas e relação genética de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de otite externa e piodermite canina.** Niterói: UFF, 2013. 105p. Tese (Doutorado em Clínica e Reprodução Animal), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.
- BAUER, A. W. Kirby Bauer method antimicrobial susceptibility testing by a standardized single disk method. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- CARDINAL, L. D. S. M.; CRUZ, F. A. F. D.; MENESES, J. P. D.; et al. Análise da terapia antimicrobiana empírica em infecção de corrente sanguínea por *Pseudomonas aeruginosa* em um hospital universitário. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 13, n. 4, p. 257-261, 2015.
- COLARES, K. T. P.; ANDRADE, A. F.; ATHAYDE, L. A. Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente em unidade de tratamento intensivo: uma revisão. **Revista Brasileira de Análises Clínicas - Suplemento Especial de Microbiologia e Micologia**, v. 48, n. 3, supl. 1, p. 15-19, 2016.
- COSTA, A. C. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *O. vulgare* L. e *Cinnamomum zeylanicum* B. contra bactérias multirresistentes.** Paraíba: UFPB, 2009. 98p. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos), Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, 2009.
- FERRAREZE, M. V. G.; LEOPOLDO, V. C.; ANDRADE, D.; et al. *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem? **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 20, n. 1, p. 7-11, 2007.
- FERREIRA, L. L. **Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa*.** Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2005. 114 p. Dissertação (Mestrado em Vigilância Sanitária), Programa de Pós-Graduação em Vigilância Sanitária, Fundação Oswaldo Cruz, 2005.
- GHELLER, B. G.; MEIRELLES, A. C. F.; FIGUEIRA, P. T.; et al. Patógenos bacterianos em cães com otite externa e seus perfis de suscetibilidade a diversos antimicrobianos. **Pubvet**, v. 11, n. 2, p. 159-167, 2017.
- MARTINS, E. A.; MOMESSO, C. S.; NARDO, C. D. D.; et al. Estudo clínico e microbiológico de otite externa de cães atendidos em hospital veterinário do noroeste paulista. **Acta Veterinaria Brasilica**, v. 5, n. 1, p. 61-67, 2011.

MATA, P. T. G.; ABEGG, M. A. Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa*. **Arquivos do Mudi**, v. 11, n. 2, p. 20-25, 2007.

MORAES, T. B.; AZAMBUJA, R. H. M.; AÑANÃ, D. C.; et al. Casuística de doenças tegumentares no Ambulatório CEVAL-UFPeL. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 41, 2014, Gramado. **ANAIS**. Gramado: SOVERGS, 2014. Disponível em: <http://www.sovergs.com.br/BKP/site_/conbravet2014/artigos/trabalhos_2044.htm> .

NETO, S. A.; LOPES, C. M. Estudo retrospectivo da ocorrência, sensibilidade e resistência antimicrobiana *in vitro* em otopatias caninas na região da grande Florianópolis – SC. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 13, n. 3, p. 37, 2016.

OLIVEIRA, L. C.; MEDEIROS, C. M. O.; SILVA, I. N. G.; MONTEIRO, A. J.; LEITE, C. A. L.; CARVALHO, C. B. M. Suscetibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 405408, 2005.

OLIVEIRA, V. B.; RIBEIRO, M. G.; ALMEIDA, A. C. S.; et al. Etiologia, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e aspectos epidemiológicos na otite canina: estudo retrospectivo de 616 casos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 33, n. 6, p. 2367-2374, 2012.

SARIDOMICHELAKIS, M. N.; FARMAKI, R.; LEONTIDES, L. S.; et al. Aetiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. **Veterinary Dermatology**, v. 18, n. 5, p. 341-347, 2007.

SILVA, A. P. D.; SCHMIDT, C.; VARGAS, A. C. D.; 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, L. C. A.; PESSOA, D. A. N.; MAIA, L. A.; et al. Systemic Infection by *Pseudomonas aeruginosa* in a Dog. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 44, supl. 1, p. 1-5, 2016.

SOUZA, A. V. G.; SALERNO, T.; SIQUEIRA, A. K.; et al. Perfil de sensibilidade microbiana em 135 linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de cães com otite. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO, 19, 2006, São Paulo. **ANAIS**. São Paulo: IBSP, 2006.

TUNON, G. I. L.; SILVA, E. P.; FAIERSTEIN, C. C. Isolamento de estafilococos multirresistentes de otites em cães e sua importância para a saúde pública. **BEPA - Boletim Epidemiológico Paulista**, v. 5, n. 58, p. 04-07, 2008.

Autor para correspondência:
Karina Affeldt Guterres.
Rua Arturus, 349, Caxias do Sul, Rio Grande do Sul, Brasil.
guterres.karina@gmail.com

4.3 Artigo 3

Toxicidade celular e espermática de óleos essenciais da família Lamiaceae

Será submetido à Revista Semina: Ciências Agrárias

Toxicidade celular e espermática de óleos essenciais da família Lamiaceae

Cell and sperm toxicity of essential oils of the Lamiaceae Family

Highlights:

O. vulgare e *O. majorana* apresentaram Gamma-Terpinene, 4-Terpineol e Alpha-Terpinene
 Toxicidade menor para *O. vulgare* < *O. majorana* < *R. officinalis*
 FT e FV, LPO e DIF não foram alterados por *O. vulgare* nas concentrações e tempo

Resumo: Pesquisas vêm sendo desenvolvidas em busca de novos princípios bioativos para combate a microrganismos patogênicos resistentes, destacando-se a utilização de extratos vegetais, como os óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*, porém para validar as plantas como medicinais e aplicabilidade como medicamentos, a determinação dos constituintes e ensaios de toxicidade, como a citotoxicidade, são fundamentais, assim como elucidar os mecanismos de ação. Uma metodologia mais recente tem sido a avaliação em células espermáticas, que pode ser realizada através de sistema computadorizado de análise de sêmen (CASA), que fornece informações sobre a cinética espermática e como método complementar na determinação da alteração ocorrida nas células, pode-se associar a citometria de fluxo. Para análise citotóxica utilizou-se células MDBK (rim bovino), sendo os óleos testados em triplicata, nas concentrações seriadas de 250 a 0,2441 µg/mL⁻¹. A cinética espermática e a citometria de fluxo foram realizadas nos dois óleos menos citotóxicos. Como resultados, os óleos essenciais apresentaram citotoxicidade alta à partir da concentração de 0,24 µg/mL⁻¹, sendo menor para *O. vulgare* < *O. majorana* < *R. officinalis*. Os óleos de *O. vulgare* e *O. majorana* apresentaram Gamma-Terpinene, 4-Terpineol e Alpha-Terpinene como componentes majoritários, e cineole, Alpha-Pinene e Camphor em *R. officinalis*. Na concentração de 20 µg/mL⁻¹ os óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. majorana* não ocasionaram alterações na cinética espermática pelo CASA, havendo alterações em todos parâmetros à partir de 40 µg/mL⁻¹. Na citometria, na concentração de 20 µg/mL⁻¹ não houve alteração significativa nos parâmetros celulares, apenas alterações em DIF e FV para *O. majorana* em 24hs. A fluidez (FT e FV), LPO e DIF não foram alterados pela adição de *O. vulgare* nas diferentes concentrações e tempo de exposição. *O. majorana* à partir de 20 µg/mL⁻¹ modificou todos os parâmetros, independente do tempo de exposição, sugerindo toxicidade maior deste. As alterações provocadas pelos óleos evidenciam os possíveis mecanismos de ação a serem explorados para aplicação farmacológica dos óleos essenciais.

Palavras-chave: CASA. Citometria de Fluxo. Citotoxicidade. Família Lamiaceae. Óleos essenciais.

Abstract: Research has been carried out in search of new bioactive principles to combat resistant pathogenic microorganisms, with emphasis on the use of plant extracts, such as the essential oils of *Origanum vulgare*,

38 *Origanum majorana* and *Rosmarinus officinalis*, but to validate the plants as medicinal and applicable as
39 medicines, the determination of constituents and toxicity tests, such as cytotoxicity, are fundamental, as well
40 as elucidating the mechanisms of action. A more recent methodology has been the evaluation in sperm cells,
41 which can be carried out through a computerized semen analysis system (CASA), which provides
42 information on sperm kinetics and as a complementary method in determining the alteration that occurred in
43 the cells, one can associate flow cytometry. For cytotoxic analysis, MDBK cells (bovine kidney) were used,
44 and the oils were tested in triplicate, in serial concentrations from 250 to 0.2441 $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$. Sperm kinetics
45 and flow cytometry were performed on the two less cytotoxic oils. As a result, the essential oils showed high
46 cytotoxicity from the concentration of 0.24 $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$, being lower for *O. vulgare* <*O. majorana* <*R.*
47 *officinalis*. The oils of *O. vulgare* and *O. majorana* presented Gamma-Terpinene, 4-Terpineol and Alpha-
48 Terpinene as major components, and cineole, Alpha-Pinene and Camphor in *R. officinalis*. At a
49 concentration of 20 $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$, the essential oils of *O. vulgare* and *O. majorana* did not cause changes in the
50 sperm kinetics by CASA, with changes in all parameters starting from 40 $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$. In cytometry, at a
51 concentration of 20 $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$ there was no significant change in cell parameters, only changes in DIF and
52 FV for *O. majorana* in 24 hours. The fluidity (FT and FV), LPO and DIF were not altered by the addition of
53 *O. vulgare* at different concentrations and time of exposure. *O. majorana* from 20 $\mu\text{g} / \text{mL}^{-1}$ changed all
54 parameters, regardless of the exposure time, suggesting greater toxicity. The changes caused by the oils show
55 the possible mechanisms of action to be explored for the pharmacological application of essential oils.

56 **Key words:** CASA. Flow Cytometry. Cytotoxicity. Lamiaceae Family. Essential oils.

57

58

Introdução

59 Inúmeras pesquisas vêm sendo desenvolvidas em busca de novos princípios bioativos para combate
60 a microrganismos patogênicos resistentes, destacando-se a utilização de extratos vegetais, como os óleos
61 essenciais de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*, que vêm demonstrando
62 propriedades antibacterianas, antifúngicas, antioxidantes, cicatrizantes, antiviral, antineoplásicas,
63 antiparasitárias, entre outras ações (LAMBERT et al., 2001; CLEFF et al., 2008; MATOS, 2014; SILVA,
64 2016, PERERA, 2016).

65 Para validar as plantas como medicinais e aplicabilidade como medicamentos, a determinação dos
66 constituintes e ensaios de toxicidade são fundamentais, assim como elucidar os mecanismos de ação
67 (GIORDANI, 2017).

68 Os ensaios de citotoxicidade são bastante utilizados para triagem de substâncias em células de
69 linhagem (pele, rim e fígado) e em cultivos primários (GIORDANI, 2017). Outra metodologia mais recente
70 tem sido a avaliação em células espermáticas, que apresentam sensibilidade similar às células somáticas e
71 uma alta sensibilidade a toxinas que provoquem alteração na estrutura celular (ANDERSSON et al., 2006;
72 ANDERSSON et al., 2010).

73 A avaliação da toxicidade em células espermáticas pode ser realizada através de sistema
74 computadorizado de análise de sêmen (CASA), que fornece informações sobre a cinética espermática. Como
75 método complementar na determinação da alteração ocorrida nas células, pode-se associar a citometria de
76 fluxo, técnica que é bastante empregada na pesquisa de fármacos, onde é possível determinar as propriedades
77 físicas e fluorescência de partículas de células, permitindo a avaliação profunda sob diversos parâmetros,
78 como respiração celular, degradação e dano de DNA, formação de espécies reativas de oxigênio e
79 integridade de membrana, dentre outros (FRITZSCHE & MANDENIUS, 2010; GREEN et al., 2011;
80 HOSSAIN et al., 2011).

81 Diante do crescimento e importância da utilização de extratos vegetais de plantas da família
82 Lamiaceae, destacando-se *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis*, na prospecção
83 de novos fármacos, objetivou-se identificar os principais compostos químicos presentes nos óleos essenciais
84 destas plantas, além de avaliar os efeitos citotóxicos em células de rim bovino (MDBK) e células
85 espermáticas de *Ovis Aries*, pelo método CASA e por citometria de fluxo.

86 87 **Material e Métodos**

88
89 As plantas da família Lamiaceae utilizadas no estudo foram obtidas de distribuidores comerciais,
90 com certificação de origem e qualidade (Luar Sul – Indústria e Comércio de Produtos Alimentícios Ltda. -
91 Santa Cruz do Sul, RS, Brasil). O extrato utilizado de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana*, *Rosmarinus*
92 *officinalis* foi o óleo essencial, sendo obtido através da submissão das folhas secas à extração com arraste de
93 vapor em Clevenger (Farmacopéia Brasileira IV), durante 4 horas. Na sequência, o óleo obtido de cada
94 planta foi seco com sulfato de sódio anidro p.a, armazenado em frasco âmbar e mantido sob refrigeração.

95 A identificação química dos compostos presentes em cada óleo essencial foi determinada por
96 cromatografia gasosa de alta eficiência (GC) com o equipamento GC/MS Shimadzu QP2010.

97 Para análise citotóxica utilizou-se células MDBK (rim bovino), cedida pelo Laboratório de
98 Virologia (LABVIR) – UFPel. Durante o experimento, as células foram mantidas em MEM (meio essencial
99 mínimo), acrescido de antibiótico, antifúngico e soro fetal bovino à 10%, e armazenadas a 37°C em estufa
100 com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Para os testes, utilizou-se placas de 96 poços com o tapete celular
101 completo onde foram adicionados os óleos (OEOV – óleo essencial de *O. vulgare*, OERO – óleo essencial de
102 *R. officinalis*, OEOM – óleo essencial de *O. majorana*) em triplicata, nas concentrações seriadas de 250 a
103 0,2441 µg/mL⁻¹. Para emulsificação dos óleos com o meio de cultura foi utilizado Tween 20 em uma
104 concentração de 1%.

105 Após 24 horas de incubação, a viabilidade celular foi avaliada utilizando o método do MTT e
106 leitura em espectrofotômetro (540 nm) (MOSMANN, 1983). As concentrações dos óleos foram classificadas
107 de acordo com MAHMOUDetal. (2011), levando em consideração o potencial tóxico, sendo considerada
108 citotoxicidade alta, moderada ou baixa, quando a viabilidade celular ficou entre 1 e 50%, 51 e 75% ou
109 entre 76 e 100%, respectivamente.

110 Para a avaliação dos efeitos nas células espermáticas, foram escolhidos os dois óleos (*O. vulgare* e
111 *O. majorana*) que apresentaram menor efeito citotóxico, utilizando-se para isto, uma fração rica de sêmen
112 ovino (*Ovis Aries*) com motilidade espermática >60%, no tempo 0 horas, diluída (1:1) em TRIS-gema. Para
113 os tratamentos, foi adicionado ao sêmen os óleos essenciais diluídos em TRIS-gema até obtenção das
114 concentrações finais de 0% (controle negativo: apenas TRIS-gema), 20 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, 40 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, 80 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e
115 160 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. O efeito dos óleos foi observado nos tempos 0 e 24 horas de contato com o sêmen, armazenados
116 sob refrigeração (17°C).

117 A cinética espermática foi avaliada através da análise computadorizada de espermatozoides
118 (CASA) no equipamento AxioScope A1 Ax10 (Zeiss), com o programa Sperm Vision©, em condições
119 isotérmicas de 37°C, sendo realizada a média de leitura em 10 campos (≥ 1000 células/campo). Os
120 parâmetros avaliados foram motilidade total (MT-%), motilidade progressiva (MP-%), distância média
121 percorrida (DAP-mm), distância curvilínea (DCL), distância linear (DSL-mm), velocidade média da
122 trajetória (VAP), velocidade curvilínea (VCL-mm/s), velocidade linear progressiva (VSL-mm/s), frequência
123 do batimento flagelar cruzado (BCF-Hz), amplitude do deslocamento lateral da cabeça (ALH-mm), oscilação
124 (WOB-Hz), linearidade (LIN-%) e retilinearidade (STR-%), dando-se ênfase aos resultados de (MT-%),
125 (MP-%), (DAP-mm), (BCF-Hz) e (ALH-mm).

126 Os parâmetros, integridade de membrana (IM), fluidez da membrana (F), índice de fragmentação
127 de DNA (DFI), espécies reativas de oxigênio (ROS) e peroxidação lipídica (LPO) foram avaliados por
128 citometria de fluxo (Attune® AcousticFocusing - Life Technologies) no dia 0 (toxicidade aguda) e 24 horas.
129 Foi utilizado laser violeta ($\lambda = 405$ nm), e as foram células coradas com Hoechst 33342, exceto para a
130 avaliação de DNA (concentração de 16,2 mM), sendo eliminados efeitos não-espermáticos (MARTINEZ-
131 ALBORCIA et al., 2012). Para as leituras foram adicionados 2 mL de tampão fosfato salino (PBS) sem
132 cálcio (80g NaCl, 11,5g KCl, 24g Na₂HPO₄, 2g KH₂PO₄ e 1L água Mili-Q), apresentando 20.000
133 eventos/análise com fluxo de 200 células. Foram utilizadas sondas fluorescentes específicas para cada
134 parâmetro avaliado, permanecendo a amostra por cinco minutos, em ausência de luz a 37°C e após
135 adicionado 500 μl de PBS sem cálcio.

136 Na avaliação de acrossoma, foram utilizados os corantes de lectina de amendoim (PNA) associado
137 ao isotiocianato de fluoresceína (FITC) (1 $\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$) (FITC-PNA), e o iodeto de propídio (IP) (7,3 μM)
138 (MARTINEZ-PASTOR et al., 2010).

139 A integridade de membrana espermática foi avaliada através da inserção dos corantes
140 Mcarboxifluoresceína diacetato (DFC) e 7,5 mM de IP, sendo os resultados expressos em % de células não
141 danificadas (DFC+IP-) (FERNANDEZ-GAGO et al., 2013).

142 A avaliação do DNA foi realizada com o corante acridina laranja, onde em 10 μL de sêmen foi
143 adicionado 5 μl de tampão TNE (0,01 M Tris-HCl, 0,15 M NaCl, 0,001 M EDTA, pH 7,2) por 30 segundos,
144 10 μl de Triton (0,1% Triton X-100) por 30 segundos, e 5 μl de acridina laranja (ácido cítrico 0,037 M,
145 Na₂HPO₄ 0,126 M, 0,0011 M de EDTA dissódico, NaCl 0,15 M, pH 6,0) (EVENSON; JOST, 1994). As
146 leituras foram realizadas em até cinco minutos, sendo os resultados expressos em índice de DNA
147 fragmentado.

148 As espécies reativas de oxigênio (ROS) foram avaliadas com 2'7'diclorofluoresceína diacetato
149 (H2DCF-DA) (1 μ M) e 7,3 μ M de IP, sendo os resultados expressos em intensidade da fluorescência verde
150 de espermatozoides não danificados (DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO et al., 2010).

151 A lipoperoxidação (LPO) foi medida utilizando 0,002 mM C11 BODIPY 581/591, sendo os
152 resultados expressos através das fluorescências verde e vermelha após duas horas, considerando a % de
153 presença de LPO (SILVA et al., 2012).

154 Para a análise estatística foi utilizado o software Statistix 9.0®, sendo utilizado o teste ANOVA, as
155 médias comparadas através do teste de Tukey e a análise estatística da citotoxicidade realizada pelo método
156 LSD, sendo considerados resultados significativos quando $p < 0,05$.

157

158

Resultados e Discussão

159

160 Em relação aos óleos analisados através de cromatografia gasosa de alta eficiência (GC), foram
161 identificados 20 compostos em *O. vulgare* sendo Gamma-Terpinene, 4-Terpineol e Alpha-Terpinene
162 majoritários, 15 compostos em *R officinalis* destacando-se Cineole, Alpha-Pinene e Camphor e 17 compostos
163 em *O. majorana* com destaque para 4-Terpineol, Gamma-Terpinene e Alpha-Terpinene (Tabela 1).

164 Em relação aos constituintes 4-terpineol e Alpha-terpineno, estes têm sido descritos como
165 responsáveis pela ação antimicrobiana de extratos de plantas família Lamiaceae (LAMBERT et al., 2001).
166 Além disso, é possível que núcleos aromáticos, contendo um grupo polar, possam fazer ligações de
167 hidrogênio com os sítios ativos de enzimas microbianas, favorecendo esta atividade (LAMBERT et al.,
168 2001).

169 HAJLAOUI e colaboradores (2016) estudaram a atividade citotóxica do óleo essencial de manjerona
170 cuja composição majoritária era 4-terpineol, cis-sabineno hidratado e gama-terpineno e obtiveram
171 citotoxicidade frente a células de carcinoma de laringe e adenocarcinoma de cólon.

172 Na análise dos óleos utilizados em nosso estudo, os compostos fenólicos monoterpênicos timol e
173 carvacrol não foram majoritários, mas estavam presentes em *O. vulgare*, entretanto tem sido citado na
174 literatura como majoritários e que estes desorganizam as proteínas constituintes de membranas celulares dos
175 microrganismos, e inibem a respiração celular (ROMERO et al., 2012). Os fenóis, como carvacrol, timol,
176 gamaterpeno e p-cimeno, representam 70,2% a 98% dos compostos ativos do óleo de *O. vulgare*
177 (CHORIANOPOULOS et al., 2004; BAMPIDIS et al., 2005), o que está em desacordo com nossos
178 resultados.

179 Diferentes mecanismos estão envolvidos na ação dos óleos essenciais sobre os microrganismos. As
180 inibições mais frequentes envolvem componentes fenólicos, que sensibilizam a bicamada lipídica da
181 membrana celular e alteram a atividade dos canais de cálcio, causando aumento da permeabilidade e
182 liberação dos constituintes intracelulares vitais (RIBEIRO, 2012). PORTO & GODOY (2001) e RIBEIRO
183 (2012), sugerem que os óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. majorana* atuem como inibidores da parede
184 celular, assim como os grupos hidroxilas fenólicos que podem causar danos ao sistema enzimático do

185 microrganismo envolvido na produção de energia e na síntese de componentes estruturais, bem como a
186 destruição ou inativação de material genético

187 Em relação ao teste de citotoxicidade em células MDBK, o Tween 20 apresentou maior viabilidade
188 celular quando comparado aos óleos de manjerona, alecrim e orégano. A viabilidade celular nas diferentes
189 concentrações de Tween 20 ficou em torno de 66%, conforme observação a seguir: Concentração de
190 $0,24\mu\text{g/mL}^{-1}$ (média 66,6%), $0,48\mu\text{g/mL}^{-1}$ (média 66,8%), $0,97\mu\text{g/mL}^{-1}$ (média 66,37%), $1,95\mu\text{g/mL}^{-1}$ (média
191 66,6%), $3,9\mu\text{g/mL}^{-1}$ (média 66,90%), $7,8\mu\text{g/mL}^{-1}$ (média 74,33%) e $15,62\mu\text{g/mL}^{-1}$ (média 58,78%). Nas
192 concentrações de $0,24\mu\text{g/mL}^{-1}$, $0,48\mu\text{g/mL}^{-1}$, $0,97\mu\text{g/mL}^{-1}$ e $15,62\mu\text{g/mL}^{-1}$, não houve diferença de
193 citotoxicidade estatisticamente significativa entre os óleos de *O. vulgare*, *O. Majorana* e *R. officinalis*. A
194 média de viabilidade celular em MDBK na concentração mais alta e na mais baixa estão apresentados a
195 seguir (Tabela 2).

196 Seguindo a classificação de MAHMOUD *et al.* (2011), os três óleos deste estudo, apresentaram
197 toxicidade alta nas concentrações testadas, com percentual de viabilidade celular variando de 1 até 49,8%.
198 Entretanto deve-se considerar que a avaliação da citotoxicidade, se dá pela adição e efeito direto dos extratos
199 nas células sem haver interferentes, e pode ser superestimada, devendo ser acompanhada de outros ensaios
200 complementares (REICHLING, *et al.* 2009).

201 Quando comparados os 3 óleos, observa-se que *R. officinalis* apresentou citotoxicidade mais elevada
202 em MDBK, este fato provavelmente é decorrente da composição química deste, que apresentou
203 majoritariamente Cineole, alpha-Pinene e Camphor, o que concorda com outros autores que citam a presença
204 de 1.8-cineole, α -pinene, camphor, verbenone e myrcene, como os principais constituintes do óleo essencial
205 (WALLER *et al.*, 2016). A citotoxicidade pode estar relacionada com a presença de alfa-pineno que é um
206 hidrocarboneto monoterpênico, sem núcleos aromáticos e grupos funcionais polares.

207 A determinação do potencial tóxico dos extratos de plantas é bastante importante, tendo em vista a
208 aplicabilidade dos resultados, já que a toxicidade pode ser um fator limitante para o uso como medicinal
209 (BLANK, 2013). Ainda, os testes em cultivos de células, minimizam o uso de animais nas etapas de
210 verificação de toxicidade, contribuindo para a avaliação da eficácia e segurança das plantas medicinais
211 (BONES & MOLETO, 2011; BRASIL, 2011). Ainda, permitem a observação das alterações celulares
212 provocadas pela substância teste, do ponto de vista microscópico, molecular e químico (MORALES, 2008).
213 A observação da viabilidade celular após a exposição ao produto testado, pode ser mensurada por diferentes
214 metodologias, sendo a técnica colorimétrica com MTT uma das mais frequentemente utilizadas. A
215 viabilidade mitocondrial, e conseqüentemente, a viabilidade celular, é quantificada pela redução do MTT a
216 formazan, o que leva a alteração de coloração e solubilidade do sal, pela atividade das desidrogenases
217 mitocondriais (MOSMANN, 1983).

218 BLANK *et al.*(2016), utilizou OEOV e OERO nas concentrações de $50\mu\text{g/mL}^{-1}$ a $0,005\mu\text{g/mL}^{-1}$,
219 obtendo maior viabilidade celular nas concentrações consideradas não tóxicas de $0,023\mu\text{g/mL}^{-1}$ (OERO),
220 $0,052\mu\text{g/mL}^{-1}$ (OEOV). Neste estudo, BLANK *et al.* (2016), observou que os óleos essenciais
221 apresentaram-se mais tóxicos quando comparados com os extratos aquosos e etanólicos das mesmas plantas,
222 sendo explicado pela mistura complexa de substâncias voláteis que são os óleos essenciais, sendo estas

223 lipofílicas, com grande quantidade de terpenos, acarretando em maior citotoxicidade dos óleos, com relação
224 aos extratos (VITTI et al., 2003).

225 GONÇALVES (2010) observou diminuição da viabilidade celular pelo método do MTT, na
226 concentração de $0,32\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$ do óleo essencial de *Thymus vulgare*, espécie pertencente à família Lamiaceae.
227 Já nas concentrações de $0,16$ e $0,08\mu\text{L}/\text{mL}^{-1}$, o óleo essencial não apresentou citotoxicidade (GONÇALVES,
228 2010).

229 Nos resultados de BLANK et al. (2016) e GONÇALVES (2010), observa-se que a concentração não
230 tóxica das plantas da família Lamiaceae, foi inferior às encontradas em nosso estudo, em que a menor
231 concentração não tóxica foi de $0,24\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Porém, SILVA (2016), ao testar os óleos essenciais de *O.*
232 *vulgare*, *O. majorana* e *R. Officinalis*, encontrou baixa toxicidade em células MDBK, nas concentrações de
233 490 e $245\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, sendo estas concentrações muito superiores às utilizadas neste experimento,
234 evidenciando que a citotoxicidade elevada dos óleos neste estudo, pode estar relacionada ao lote das plantas
235 e consequentemente composição química dos mesmos.

236 Devido a citotoxicidade superior de *R. officinalis* elencou-se os óleos essenciais de *Origanum vulgare*
237 e *Origanum majorana*, para a avaliação da toxicidade espermática, através do CASA e de Citometria de
238 fluxo.

239 Na avaliação da motilidade espermática total e progressiva pelo CASA, após contato com o óleo
240 essencial de *Origanum vulgare*, observou-se no momento 0 e em 24 horas, diferença estatística entre os
241 tratamentos. Observa-se que a MT e MP aumentou, embora sem diferença estatística, nas concentrações de
242 $20\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ e $40\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ em ambos os tempos (Tabela 3). A melhora da MT e MP pode ser devido à resposta
243 das células frente à injúria, como uma medida de proteção, aumentando desta forma a motilidade
244 (HARAYASHIKI, 2013).

245 Já na concentração de $160\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ de OEOV ocorreu redução drástica da MT e MP, sugerindo
246 toxicidade celular. Segundo alguns autores, a redução da motilidade espermática pode estar relacionada com
247 alterações na mitocôndria, devido a esta ser responsável pela produção de energia, que seria necessária para
248 o movimento celular o que poderia ocasionar em espermatozoides imóveis (ORTEGA-FERRUSOLA et al.,
249 2011).

250 Nos parâmetros DAP, ALH e BCF, não houve diferença estatística no tempo 0 horas, do controle 0
251 (TG) para a menor concentração ($20\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) havendo no parâmetro DAP, diferença estatística entre todas as
252 concentrações testadas. Em relação ao parâmetro ALH, somente as concentrações de 80 e $160\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ não
253 diferiram estatisticamente, já no parâmetro BCF nas concentrações de 80 e $160\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ houve diferença
254 estatística, porém $80\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ não diferiu de $40\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ que não diferiu de $20\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ (Tabela 3).

255 Quando avaliado o OEOM, não houve diferença estatística do controle 0 (TRIS-gema) em todos os
256 parâmetros avaliados, tanto em zero horas quanto em 24 horas, para a concentração de $20\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.
257 Entretanto, houve diferença estatística à partir da concentração de 40 até $160\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ nos tempos 0 e 24
258 horas, em todos os parâmetros avaliados. O parâmetro ALH ($\mu\text{m}/\text{s}$) nas concentrações de 40 e $20\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ no
259 tempo 0 horas e o parâmetro BCF (Hz), nas mesmas concentrações, no tempo 0 e 24 horas, não diferiram
260 estatisticamente (Tabela 4).

261 A amplitude de deslocamento lateral da cabeça (ALH - μm) é um parâmetro relacionado com a
262 capacidade de penetração na zona pelúcida do óvulo, já a frequência de batimento flagelar cruzado (BCF-
263 Hz) é o número de vezes que a cabeça do espermatozóide cruza a direção do movimento e a DAP se refere a
264 distância média percorrida (AMANN & KATZ, 2004). Sendo que a diminuição destes parâmetros, assim
265 como MT e MP tem relação direta com danos sofridos pela célula, como em casos de toxicidade que pode
266 ser causada pelo tempo de contato com os compostos químicos presentes nos extratos e suas concentrações,
267 danificando ou sobrecarregando a célula (GIORDANI, 2017).

268 Quanto aos resultados obtidos na citometria de fluxo, de modo geral, todos os parâmetros
269 espermáticos avaliados não sofreram alterações significativas na concentração de 20 a $40\mu\text{g/mL}^{-1}$ de OEOV
270 nas 24hs de exposição. Sendo que não observou-se no tempo zero e 24 horas, diferença estatística entre as
271 concentrações testadas e o controle, com exceção de AR 0 horas (20 até $160\mu\text{g/mL}^{-1}$), IM ($40\mu\text{g/mL}^{-1}$) e
272 ROS 24 horas ($40\mu\text{g/mL}^{-1}$) (Tabela 5).

273 Com relação ao OEOM, no tempo 0 horas, não houve diferença estatística do controle para a
274 concentração $20\mu\text{g/mL}^{-1}$ em praticamente todos os parâmetros, exceto ROS. Na maior concentração testada
275 ($160\mu\text{g/mL}^{-1}$), não houve diferença estatística do controle, nos parâmetros FV, IM, LPO e DFI (Tabela 6). Já
276 no tempo 24 horas, não houve diferença estatística em todas as concentrações testadas somente no parâmetro
277 FT. O controle de FV não diferiu estatisticamente da concentração $80\mu\text{g/mL}^{-1}$ assim como ROS, em que
278 $p>0,05$ somente quando comparado a concentração de $160\mu\text{g/mL}^{-1}$ (Tabela 6).

279 Observa-se neste estudo, o aumento da fluidez total em 24hs para ambos óleos em todas
280 concentrações e fluidez viável em 40 e $80\mu\text{g.mL}^{-1}$ mesmo não havendo diferença estatística em algumas
281 concentrações. O aumento da fluidez, em processos fisiológicos, é essencial para capacitação espermática ou
282 alteração da membrana, porém, do ponto de vista tóxico, tem sido sugerido como responsável pela
283 diminuição da motilidade espermática devido ao enfraquecimento das ligações de Van der Waals presentes
284 entre as regiões hidrofóbicas dos lipídios, podendo acarretar em alterações de permeabilidade, permitindo a
285 entrada de íons e pequenas moléculas, vindo a desestabilizar a membrana e provocar danos, levando até
286 mesmo a morte celular (SERGENT et al., 2005; SIERRA-VALDEZ et al., 2013). Objetivando uma nova
287 opção terapêutica frente a microrganismos, o aumento da FT e FV seria benéfico, pois facilitaria a entrada de
288 fármacos e danos à membrana, acarretando em morte celular.

289 Em relação ao parâmetro LPO, não houve diferença estatística nos tempos 0 e 24 horas, quando
290 utilizado o OEOV, ao contrário de quando testado OEOM, em ambos os tempos, havendo diferença no
291 controle e as concentrações intermediárias de 40 e $80\mu\text{g/mL}^{-1}$ ($p>0,05$).

292 Os óleos OEOV e OEOM não interferiram no parâmetro DFI, apesar de ter havido no OEOM
293 aumento de LPO em algumas concentrações, o que está de acordo com outros autores (LIU et al., 2002;
294 HASSAN et al.,2015) que demonstraram que extratos com capacidade de aumentar a expressão de
295 antioxidantes, como de *Panax ginseng*, suprimem a fragmentação de DNA, através da inibição da expressão
296 de gene pró-apoptótico e atuam contra a progressão de danos no DNA provocados pelo estresse oxidativo.
297 GIORDANI (2017) ao avaliar extrato de *Schinus terebinthifolius* sugeriu que a presença de substâncias
298 antioxidantes, poderia estar relacionada com a não interferência na DFI.

299 Na IM, não houve interferência com o OEOV, independente da concentração, entretanto quando
300 utilizado o OEOM, nas concentrações de 40 e 80µg/mL⁻¹, houve aumento deste parâmetro, diferindo
301 estatisticamente do controle.

302 Dessa forma, a manutenção do potencial de integridade de membrana, observada em todas as
303 concentrações do OEOV, reflete a ausência de toxicidade nas células espermáticas, sendo este óleo uma
304 alternativa promissora na busca por novos fármacos frente à microrganismos patogênicos resistentes.

305 As concentrações intermediárias de OEOM (40 e 80µg/mL⁻¹) apresentaram alterações prejudiciais no
306 IM, assim como ocorreu nos parâmetros FT, FV e LPO, em diferentes concentrações, podendo sugerir que o
307 OEOM, agiu diretamente na estrutura de membrana e lipoperoxidação. Esta forma de atuação de OEOM, foi
308 semelhante à relatada por outros autores como RIBEIRO (2012) e ROMERO et al. (2012), que citam a
309 sensibilização da bicamada lipídica da membrana celular, alterando a atividade dos canais de cálcio,
310 causando aumento da permeabilidade de membrana e liberação dos constituintes intracelulares vitais das
311 bactérias, acarretando morte celular ao serem testados os compostos químicos presentes neste estudo, como o
312 4-Terpineol.

313 Nas avaliações realizadas, observa-se em muitos momentos, que concentrações intermediárias foram
314 capazes de gerar danos maiores às células que concentrações mais altas. Estas alterações também foram
315 observadas por HARAYASHIKI (2013), ao trabalhar com os efeitos de glifosato frente à *Poecilia vivípara*,
316 sugerindo que concentrações mais baixas não estimulariam respostas celulares frente às injúrias, já em
317 concentrações intermediárias haveria um estresse celular, acarretando em mecanismos de proteção celular,
318 não ocorrendo nas concentrações mais altas, em que a célula afetada, já não teria mais como responder à
319 toxicidade sofrida. Outra explicação pode estar relacionada com a interação dos compostos fenólicos dos
320 óleos com os fosfolipídios da membrana espermática, alterando-os e conseqüentemente desestabilizando a
321 membrana plasmática pelo aumento da sua fluidez (HARTWIG et al., 2012).

322 A membrana está envolvida na capacitação, reação do acrossoma e fertilização, e a partir dela, existe
323 o funcionamento correto das células, porém, não sendo fundamentais para processos pós-concepção (ROTA
324 et al., 2010). O aumento da fluidez de membrana, do ponto de vista reprodutivo, é essencial para a
325 capacitação do espermatozoide ou alteração da membrana plasmática (NAKAGAWA et al., 2004), porém
326 em termos de toxicidade, esse aumento pode estar envolvido na apoptose (SERGENT et al. 2005).

327 Assim como *Origanum vulgare* e *Origanum majorana*, outras plantas utilizadas na medicina popular
328 já foram utilizadas em testes com células espermáticas. *Foeniculum vulgare* (erva-doce) foi capaz de reduzir
329 danos causados pelo estresse oxidativo, como a fragmentação de DNA e a peroxidação lipídica, em células
330 espermáticas de javali pós-congelamento (MALO et al., 2012). *Salvia officinallis* (sálvia) e o *Rosmarinus*
331 *officinalis* (alecrim), ambas da família Lamiaceae, demonstraram aumento da viabilidade e da motilidade
332 espermática e redução da lipoperoxidação da membrana plasmática (MALO et al., 2010; MALO et al., 2011;
333 MONTON et al., 2015), diferentemente do que foi observado neste estudo, em que o óleo essencial de *O.*
334 *majorana* diminuiu MT, MP e aumentou LPO, esta última em concentrações intermediárias.

335

336

Conclusão

337

338 Os óleos essenciais apresentaram citotoxicidade alta à partir da concentração de 0,24 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$, sendo
 339 menor para *O. vulgare* < *O. majorana* < *R. officinalis*. Os óleos de *O. vulgare* e *O. majorana* apresentaram
 340 Gamma-Terpinene, 4-Terpineol e Alpha-Terpinene como componentes majoritários, e cineole, Alpha-Pinene
 341 e Camphor em *R. officinalis*. Na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ os óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. majorana*
 342 não ocasionaram alterações na cinética espermática pelo CASA, havendo alterações em todos parâmetros à
 343 partir de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$. Na citometria, na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ não houve alteração significativa nos
 344 parâmetros celulares, apenas alterações em DIF e FV para *O. majorana* em 24hs. A fluidez (FT e FV), LPO
 345 e DIF não foram alterados pela adição de *O. vulgare* nas diferentes concentrações e tempo de exposição. *O.*
 346 *majorana* à partir de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ modificou todos os parâmetros, independente do tempo de exposição,
 347 sugerindo toxicidade maior deste. As alterações provocadas pelos óleos evidenciam os possíveis mecanismos
 348 de ação a serem explorados para aplicação farmacológica dos óleos essenciais.

349

350

Referências

351

352 AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **J Androl**, v.25, p.317-325, 2004.

353

354 ANDERSSON, M.C.; MIKKOLA, R.; KOTIAHO, M.; HOORNSTRA, D.; ANDERSSON, M.A.;
 355 SALKINOJA-SALONEN, M. Boar spermatozoa as a tool in toxicological research, a novel application for
 356 extended boar semen commercially produced by AI stations. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, n.4,
 357 p.303-303, 2006.

358

359 ANDERSSON, M.A.; MIKKOLA, R.; RASIMUS, S.; HOORNSTRA, D.; SALIN, P.; RAHKILA, R.;
 360 HEIKKINEN, M.; MATTILA, S.; PELTOLA, J.; KALSO, S.; SALKINOJA-SALONEN, M. Boar
 361 spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosol. **Toxicology In Vitro**,
 362 v.24, n.7, p.2041-2052, 2010.

363

364 BAMPIDIS, V. A.; CHRISTODOULOU, V.; FLOROU-PANERI, P.; et al. Effect of dietary dried oregano
 365 leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing
 366 turkeys. **British Poultry Science**, v. 46, n. 5, p. 595-601, 2005.

367

368 BAYDAR, H.; SAĞDIÇ, O.; ÖZKAN, G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of
 369 essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey.
 370 **Food Control**, v. 15, n. 3, p. 169-172, 2004.

371

372 BLANK, D. **Investigação da citotoxicidade e atividade anti-viral dos extratos de plantas da família**
 373 **Lamiaceae**. 2013. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e
 374 de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

375

376 BLANK , D. E.; Hörnke, A. G.; ; FREITAG, R. A. ; CORRÊA, R. A. ; HÜBNER, S. O. 5 ; CLEFF, M. B.
 377 Composição química e citotoxicidade de *Origanum vulgare L.* e *Rosmarinus officinalis L.* **Science and**
 378 **animal health.** v.4 n.2. p. 117-130, 2016.

379 BONES, V. C.; MOLETO, C. F. M. Alternativas ao uso de animais de laboratório no Brasil. **Veterinária em**
 380 **Foco**, v.10, n.1, p.103-112, 2012.

381

382 BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira.
 383 Brasília: ANVISA, 2011. 126p.

384

385 CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; et al. Essential Oils of *Satureja*,
 386 *Origanum*, and *Thymus* Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne
 387 Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8261–8267, 2004.

388

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

392

393 DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; BISBAL, A.F.; ROS-SANTAELLA, J.L.;
 394 GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A.J.; GARDE, J.J.; FERNÁNDEZ-
 395 SANTOS, M.R. Response
 396 of thawed epididymal red deer spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of
 397 individual male variability. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, n.3, p.393-403, 2011.

398

399 EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. **Methods in Cell Biology**,
 400 v.42, p.159-176, 1994.

401

402 FERNANDEZ-GAGO, R.; DOMINGUEZ, J.C.; MARTINEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-
 403 thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. **Theriogenology**, v.80, n.4, p.400-410,
 404 2013.

405

406 FERRAREZE, M.V.G.; LEOPOLDO, V.C.; ANDRADE, D.; SILVA, M.F.I. HAAS,
 407 V.J. ***Pseudomonas aeruginosa* multiresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que**
 408 **procedem?** *Acta Paul Enferm* 2007;20(1):7-11.

409

410 FRITZSCHE, M.; MANDENIUS C. Fluorescent cell-based sensing approaches for toxicity testing.
 411 **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.398, n.1, p.181-191, 2010.

- 412
413 GIORDANI, Claudia. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos**
414 **alternativos**. 2017. 150f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária,
415 Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.
- 416
417 GONÇALVES, M.J., CRUZ, M.T., CAVALEIRO, C., LOPES, M.C., SALGUEIRO, L. **Industrial**
418 **Crops and Products** 32, 70–75, 2010.
- 419
420 GREEN, C.L.; BROWN, L.; STEWART, J.J.; XU, Y.; LITWIN, V.; MC CLOSKEY, T.W.
421 Recommendations for the validation of flow cytometric testing during drug development: I instrumentation.
422 **Journal of Immunological Methods**, v.363, n.2, p.104–119, 2011.
- 423
424 HAJLAOUI, H.; MIGHRI, H.; AOUNI, M.; GHARSALLAH, N.; KADRI, A. Chemical composition and in
425 vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of
426 Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. **Microbial Pathogenesis**, v.95, p.86-94, 2016.
- 427
428 HARAYASHIKI, C.A.Y., JUNIOR, A.S.V., MACHADO, A.A.S., CABRERA, L.C., PRIMEL, E.G.,
429 BIANCHINI, A., CORCINI, C.D., Toxic effects of the herbicide Roundup in
430 the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. **Aquatic Toxicology** (2013).
- 431
432 HARTWIG, F.P.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JUNIOR, J. Utilização do colesterol na criopreservação de
433 espermatozoides na espécie equina: Uma revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.2, p.157-168, 2012.
- 434
435 HASSAN, A.M.; ABDEL-AZIEM, S.H.; EL-NEKEETY, A.A.; ABDEL-WAHHAB, M.A. *Panax ginseng*
436 extract modulates oxidative stress, DNA fragmentation and up-regulate gene expression in rats sub
437 chronically treated with aflatoxin B1 and fumonisin B1. **Cytotechnology**, v.67, n.5, p.861-871, 2015.
- 438
439 HOSSAIN, M.S.; JOHANNISSONA, A.; WALLGRENA, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A.P.; RODRIGUEZ-
440 MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: State of the
441 art. **Asian Journal of Andrology**, v.13, n.3, p.406-419, 2011.
- 442
443 LAMBERT, R. J. W.; SKANDAMIS, P. N.; COOTE, P. J. A. Study of the minimum inhibitory
444 concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal Applied of**
445 **Microbiology**, v.91, p.453-462, 2001.
- 446
447 LIU, Z.; LI, Z., LIU, X. Effect of ginsenoside Re on cardiomyocyte apoptosis and expression of Bcl-2/Bax
448 gene after ischemia and reperfusion in rats. **J. Huazhong University of Science and Technology**, v.22, n.4,
449 p.305–309, 2002.

450

451 MALO, C.; GIL, L.; CANO, R.; GONZALEZ, N.; LUÑO, V. Fennel (*Foeniculumvulgare*) provides
452 antioxidante protection for boar semen cryopreservation. **Andrologia**, v.44 (Suppl 1), p.710-715, 2012.

453

454 MALO, C.; GIL, L.; CANO, R.; MARTÍNEZ, F.; GALÉ, I. Antioxidant effect of rosemary
455 (*Rosmarinusofficinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. **Theriogenology**, v.75,
456 p.1735-1741, 2011.

457 MALO, C.; GIL, L.; GONZALEZ, N.; MARTÍNEZ, F.; CANO, R.; BLAS, I.; ESPINOSA, E. Anti-oxidant
458 supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison
459 between cysteine and rosemary (*Rosmarinusofficinalis*). **Cryobiology**, v.61, p.142–147, 2010.

460

461 MAHMOUD, T.S.; MARQUES, M.R.; PESSOA, C.O. et al. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle
462 West plant extracts. *Rev. bras. farmacog.*, v.21, n.3, p.456-464, 2011.

463

464 MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; MORRELL, J.M.; GIL, M.A.; BARRANCO, I.; MASIDE, C.; ALKMIN,
465 D.V.; PARRILLA, I.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. Suitability and effectiveness of single layer
466 centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa. **Animal**
467 **Reproduction Science**, v.140, n.3-4, p.173-179, 2012.

468

469 MARTINEZ-PASTOR, F.; MARTÍNEZ, F.; GARCÍA-MACÍAS, V.; ESTESO, M.C.; ANEL, E.;
470 FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; SOLER, A.J.; DE PAZ, P.; GARDE, J.; ANEL, L. A pilot study on post-
471 thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol
472 concentration and extender osmolality. **Theriogenology**, v.66, n.5, p.1165–1172, 2006.

473

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

476

477 MONTON, A.; GIL, L.; MALO, C.; OLACIREGUI, M; GONZALEZ ,N.; BLAS, I. Sage (*Salvia officinalis*)
478 and fennel (*Foeniculumvulgare*) improve cryopreserved boarepididymal semen quality study. **Cryo Letters**,
479 v.36, n.2, p.83-90, 2015.

480

481 MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou
482 realidade? **Ciência e Cultura**, v.60, n.2, p.33-36, 2008.

483

484 MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **J ImmunolMethods**, v.65, p.55-
485 63, 1983.

486

- 487 NAKAGAWA, K.; YAMANO, S.; KAMADA, M.; MAEGAWA, M.; TOKUMURA, A.; IRAHARA, M.;
488 SAITO, H. Sperm-immobilizing antibodies suppress an increase in the plasma membrane fluidity of human
489 spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.83, p.1054-1058, 2004.
- 490
- 491 ORTEGA-FERRUSOLA, C., GARCIA, B.M., GALLARDO-BOLAÑOS, J.M., GONZALEZ-
492 FERNANDES, L., RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H., TAPIA, J.A., PEÑA, F.J., 2009. Apoptotic markers can
493 be used to forecast the freeze ability of stallion SPERMATOOZOA. **ANIM. REPROD. SCI.** 114, 393-403.
- 494
- 495 OSKAY, M.; SARI, D. Antimicrobial screening of some Turkish medicinal plants. **Pharm Biol.** p. 176–181,
496 2007.
- 497
- 498 PORTE, A.; GODOY, R. L. O. Alecrim (*Rosmarinusofficinalis L.*): Propriedades antimicrobiana e química
499 do óleo essencial. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 19, n. 2, p.193-210,
500 2001.
- 501
- 502 REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.; SUSCHKE, U.; SALLER,R. Essential oils of aromatic plants with
503 antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an overview.
504 *ForschendeKomplementärmedizin*, v.16, p.79-90, 2009.
- 505
- 506 RIBEIRO, D. S.; MELO, D. B.; GUIMARÃES, A. G.; VELOZO, E. S. Avaliação do óleo essencial de
507 alecrim (*RosmarinusofficinalisL.*) como modulador da resistência bacteriana. *Semina: Ciências Agrárias*,
508 Londrina, v. 33, n. 2, p. 687-696, abr. 2012.
- 509
- 510 ROMERO, A. L. et al. Composição química e atividade do óleo essencial de *Origanumvulgares*sobre fungos
511 fitopatogênicos. **Revista Unopar Científica Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 14, n. 4, 2012.
- 512
- 513 ROTA, A.; BASTIANACCI, V.; MAGELLI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Evaluation of plasma
514 membrane integrity of donkey spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.228–232, 2010.
- 515
- 516 SERGENT, O.; PEREIRA, M.; BELHOMME, C.; CHEVANNE, M.; HUC, L.; LAGADIC-GOSSMANN,
517 D. Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. **Journal of**
518 **Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.313, p.104–111, 2005.
- 519
- 520 SIERRA-VALDEZ, F. J.; FORERO-QUINTERO, L. S.; ZAPATA-MORIN, P. A.; COSTAS, M.;
521 CHAVEZ-REYES, A.; RUIZ-SUÁREZ, J. C. The Influence of Non Polar and Polar Molecules in Mouse
522 Motile Cells Membranes and Pure Lipid Bilayers. **PLOS ONE**, v.8, n.4, p.1-6, 2013.
- 523

- 524 SILVA, E.C.B., CAJUEIRO, J.F.P., SILVA, S.V. et al. Effect of antioxidants 1 resveratrol and quercetin on
525 *in vitro* evaluation of frozen ram sperm. **Theriongelonogy**, v.77, p.1722-1726, 2012.
- 526
- 527 SILVA, C. C. **Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos caninos e determinação da atividade**
528 **citotóxica de produtos vegetais frente a células neoplásicas (B16F10) e não neoplásicas (MDBK)**. 2016.
529 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de
530 Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.
- 531
- 532 PERERA, S.C. Identificação de ovos de *Diocotophyma renale* no ambiente e na urina de cães e gatos de
533 Pelotas, e avaliação *in vitro* de extratos vegetais da família Lamiaceae sobre os ovos do nematódeo. 2016. 80
534 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Bioquímica e Bioprospeção, Faculdade de
535 Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.
- 536
- 537 ULTEE, A.; SMID, E.J. **Influence of carvacrol on growth and toxin production by *Bacillus cereus***.
538 *International Journal of Food Microbiology*, v.64, 373-378, 2001.
- 539 VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**, v. 17, p. 1- 26, 2003.
- 540
- 541

542
543
544
545
546

Tabela 1- Compostos químicos identificados nos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Origanum majorana* e *Rosmarinus officinalis* por Cromatografia gasosa de alta eficiência (GC).

Óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	Óleo essencial de <i>R. officinalis</i>	Óleo essencial <i>O. majorana</i>
Alpha-Thuiene	Alpha-Pinene	4-Carene
Alpha-Pinene	Camphene	Sabinene
Beta-Terpinene	Sabinen	Beta-Myrcene
Beta-Myrcene	Beta-Pinene	Alpha-Phellandrene
Alpha-Terpinene	Alpha-Terpinen	Alpha-Terpinene
O-Cymene	Cineole	O-Cymol
Trans-Sabinenehydrate	Gamma-Terpinene	Beta-Phellandrene
Beta-Phellandrene	Linalool	Gamma-Terpinene
Beta-trans-Ocimene	Camphor	5-isoprpyl-2-
Gamma-Terpinene	Isoborneol	Alpha-Terpinolen
Delta-2-Carene	Terpinen-4-ol	
Cis-Sabinenehydrate	Alpha-Terpineol	4-Terpineol
4-Terpineol	Bornylacetate	Alpha-Terpineol
Alpha-Terpineol	Caryophyllene	Bergamol
Thymolmethylether	Alpha-Humulene	Caryophyllene
Isothymolmethylether	_____	Gamma-Elemene
Linaloolacetate	_____	4-isopropyl-1-methyl-2-
	_____	cyclohexen-2-ol
Carvacrol	_____	_____
Caryophyllene	_____	_____

547
548
549

Tabela 2 – Citotoxicidade em células MDBK dos óleos essenciais de *O. vulgare*, *R. officinalis* e *O. majorana*, na maior (250 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) e menor (0,24 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$) concentração testada.

Concentrações ($\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$)		MDBK (média% células viáveis)
OEOV	250 ^A	11,160
	0,24 ^{AB}	49,823
OERO	250 ^A	1,060
	0,24 ^B	11,403
OEOM	250 ^A	5,3667
	0,24 ^{AB}	39,453

550
551

OEOV: óleo essencial de *O. vulgare*; OERO: óleo essencial de *R. officinalis*;
OEOM: óleo essencial de *O. majorana*.

552
553

554
555
556

Tabela 3- Média dos parâmetros de motilidade, distância, amplitude de deslocamento e batimento flagelar das células espermáticas submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial de *Origanum vulgare* nos tempos de exposição 0 e 24 horas.

557

PARÂMETROS	O HORAS				
	0 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (TG)	20 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	80 $\mu\text{g.mL}^{-1}$	160 $\mu\text{g.mL}^{-1}$
MT	66,3 ^{ABC}	68,90 ^{AB}	75,57 ^A	56,59 ^C	7,99 ^D
MP	58,16 ^{ABC}	61,47 ^{AB}	66,47 ^A	47,79 ^C	3,98 ^D
DAP ($\mu\text{m/s}$)	29,34 ^{AB}	26,79 ^B	31,52 ^A	22,14 ^C	14,33 ^D
ALH ($\mu\text{m/s}$)	3,17 ^{BC}	3,16 ^{BC}	3,91 ^A	2,57 ^D	2,57 ^D
BCF (Hz)	33,74 ^A	30,91 ^{ABC}	28,33 ^{CD}	26,26 ^D	22,39 ^E
	24 HORAS				
MT	26,41 ^D	73,01 ^A	52,73 ^B	28,47 ^D	3,59 ^E
MP	18,61 ^E	66,42 ^A	45,55 ^C	20,18 ^E	1,71 ^F
DAP ($\mu\text{m/s}$)	21,54 ^C	31,35 ^A	26,46 ^B	20,49 ^C	7,06 ^D
ALH ($\mu\text{m/s}$)	2,41 ^{CD}	3,15 ^{AB}	2,67 ^C	2,08 ^D	1,28 ^E
BCF (Hz)	26,94 ^{AB}	27,61 ^{AB}	27,81 ^{AB}	24,76 ^B	13,84 ^C

558
559
560
561
562

^{ABCD}Letras diferentes correspondem a diferença estatística significativa entre as concentrações na avaliação de um mesmo parâmetro ($p < 0,05$). TG: TRIS-gema, MT: Motilidade total, MP: Motilidade progressiva, DAP: Distância média percorrida, ALH: Amplitude do deslocamento lateral da cabeça, BCF: Frequência do batimento flagelar cruzado.

563

564

565

566
567
568
569

Tabela 4-Média dos parâmetros de motilidade, distância, amplitude de deslocamento e batimento flagelar das células espermáticas submetidas a diferentes concentrações do óleo essencial de *Origanum majorana* nos tempos de exposição 0 e 24 horas.

	0µg/mL ⁻¹ (TG)	20µg/mL ⁻¹	40µg/mL ⁻¹	80µg/mL ⁻¹	160µg/mL ⁻¹
PARÂMETROS					
0 HORAS					
MT	71,03 ^A	73,193 ^A	64,419 ^B	8,225 ^C	8,036 ^C
MP	65,177 ^A	70,022 ^A	58,962 ^B	5,683 ^C	4,017 ^C
DAP	29,070 ^A	25,894 ^A	21,638 ^B	13,908 ^C	6,822 ^D
ALH	3,0186 ^A	2,5893 ^{AB}	2,1936 ^B	1,4438 ^C	0,9340 ^D
BCF	33,659 ^A	31,174 ^A	29,353 ^A	21,073 ^B	10,365 ^C
24 HORAS					
MT	66,944 ^A	66,737 ^A	47,797 ^B	6,409 ^C	2,741 ^C
MP	62,670 ^A	61,835 ^A	40,974 ^B	3,531 ^C	0,817 ^C
DAP	26,888 ^A	25,330 ^A	20,462 ^B	9,813 ^C	2,904 ^D
ALH	2,4174 ^A	2,4840 ^A	1,9790 ^B	1,1136 ^C	0,4536 ^D
BCF	33,208 ^A	30,986 ^{AB}	27,382 ^B	16,928 ^C	5,918 ^D

570
571
572
573
574
575
576
577

^{ABCD}Letras diferentes correspondem a diferença estatística significativa entre as concentrações na avaliação de um mesmo parâmetro ($p < 0,05$). TG: TRIS-gema MT: Motilidade total, MP: Motilidade progressiva, DAP: Distância média percorrida, ALH: Amplitude do deslocamento lateral da cabeça, BCF: Frequência do batimento flagelar cruzado.

578
579
580
581
582
583
584
585
586
587
588
589
590
591
592
593
594
595
596
597

Tabela 5- Resultados obtidos a partir da avaliação espermática por citometria de fluxo com diferentes concentrações de óleo essencial de *O. vulgare*, no tempo 0 e 24 horas.

	0µg/mL ⁻¹ (TG)	20µg/mL ⁻¹	40µg/mL ⁻¹	80µg/mL ⁻¹	160µg/mL ⁻¹	
	PARÂMETROS					
	O HORAS					
	FT	64,530 ^A	67,943 ^A	74,728 ^A	77,882 ^A	73,250 ^A
	FV	19,902 ^A	10,360 ^A	11,217 ^A	8,613 ^A	7,595 ^A
	AR	73,725 ^A	43,878 ^B	69,455 ^A	31,688 ^B	19,215 ^B
	IM	46,457 ^{BC}	40,060 ^C	74,461 ^A	59,118 ^{AB}	58,284 ^{AB}
	LPO	39,903 ^A	40,182 ^A	39,539 ^A	39,139 ^A	38,716 ^A
	DFI	85,943 ^A	87,564 ^A	91,419 ^A	91,653 ^A	88,202 ^A
	ROS	58,508 ^A	60,173 ^A	59,584 ^A	60,313 ^A	51,900 ^A
	24 HORAS					
	FT	73,013 ^A	73,238 ^A	73,385 ^A	78,035 ^A	75,853 ^A
	FV	28,053 ^A	30,915 ^A	31,588 ^A	33,597 ^A	27,374 ^A
	AR	47,967 ^A	42,182 ^A	48,802 ^A	44,093 ^A	24,330 ^A
	IM	44,510 ^B	48,386 ^B	91,257 ^A	59,045 ^B	56,952 ^B
	LPO	58,405 ^A	52,479 ^A	53,590 ^A	52,211 ^A	52,800 ^A
	DFI	92,491 ^A	94,120 ^A	93,540 ^A	93,904 ^A	93,816 ^A
	ROS	38,605 ^B	4317 ^B	123008 ^A	2184 ^B	7929 ^B

^{ABC}Letras diferentes correspondem a diferença estatística significativa entre as concentrações na avaliação de um mesmo parâmetro ($p < 0,05$). TG: TRIS-gema; AR: Acrossoma Reagido; IM: Integridade de Membrana; DFI: Índice de fragmentação de DNA; FT: Fluidez Total; FV: Fluidez Viáveis; ROS: Espécies Reativas de Oxigênio; PMM: Potencial de Membrana Mitocondrial; LPO: Lipoperoxidação.

598
599Tabela 6- Resultados obtidos a partir da avaliação espermática por citometria de fluxo com diferentes concentrações de óleo essencial de *O. majorana*, no tempo 0 e 24horas.

PARÂMETRO	0µg/mL ⁻¹ (TG)	20µg/mL ⁻¹	40µg/mL ⁻¹	80µg/mL ⁻¹	160µg/mL ⁻¹
0 HORAS					
FT	66,255 ^A	64,915 ^A	69,312 ^A	77,512 ^B	79,918 ^B
FV	19,258 ^B	10,293 ^B	43,318 ^A	53,187 ^A	15,083 ^B
AR	26,698 ^B	31,133 ^B	22,24 ^B	59,522 ^A	62,082 ^A
IM	46,084 ^C	49,377 ^C	77,665 ^A	70,547 ^{AB}	55,013 ^{BC}
LPO	41,371 ^B	40,339 ^B	65,524 ^A	66,15 ^A	44,734 ^B
DFI	82,24 ^A	87,105 ^A	95,047 ^A	94,533 ^A	94,299 ^{Ac}
ROS	1930,8 ^C	3649,3 ^B	831 ^C	1712,3 ^C	6812,8 ^A
24 HORAS					
FT	70,617 ^A	73,605 ^A	72,463 ^A	71,358 ^A	76,363 ^A
FV	39,015 ^B	3,177 ^C	57,502 ^A	48,290 ^{AB}	7,422 ^C
AR	50,530 ^A	64,205 ^A	18,633 ^B	17,572 ^B	57,907 ^A
IM	34,921 ^B	48,143 ^B	70,929 ^A	66,419 ^A	47,483 ^B
LPO	40,671 ^{CD}	41,025 ^C	67,495 ^B	74,099 ^A	38,294 ^D
DFI	93,688 ^A	87,223 ^B	95,640 ^A	94,736 ^A	91,024 ^{AB}
ROS	2460 ^B	3882 ^B	886 ^B	1522 ^B	14011 ^A

600

601

602

603

604

605

^{ABCD}Letras diferentes correspondem a diferença estatística significativa entre as concentrações na avaliação de um mesmo parâmetro ($p < 0,05$). TG: TRIS-gema; AR: Acrossoma Reagido; IM: Integridade de Membrana; DFI: Índice de fragmentação de DNA; FT: Fluidez Total; FV: Fluidez Viáveis; ROS: Espécies Reativas de Oxigênio; LPO: Lipoperoxidação.

5 Considerações Finais

- Os isolados caninos de *Pseudomonas* spp. apresentaram alta taxa de multiresistência (46,7%) aos antimicrobianos, em especial aos B-lactâmicos, sendo sensíveis para Quinolonas, Gentamicina e Imipenem.
- Todos os óleos essenciais inibiram os isolados, formando halos de inibição maiores para *R. officinalis* seguido de *O. majorana* e *O. vulgare*, havendo sinergismo em 90% das associações dos óleos com os antimicrobianos, sendo estes óleos essenciais promissores para sequência de avaliações no tratamento de enfermidades causadas pelo gênero *Pseudomonas*.
- *Pseudomonas aeruginosa* esteve presente em 11% do total de casos de otite canina diagnosticados no período de 2010 a 2018 no Laboratório Regional de Diagnósticos da FaVet – UFPel, sendo fundamental o seu isolamento e identificação para a implementação de terapia individualizada para os animais, assim como para o controle de resistência bacteriana.
- Os óleos essenciais apresentaram citotoxicidade alta partir da concentração de 0,24 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$, sendo menor para *O. vulgare* < *O. majorana* < *R. officinalis*.
- Os óleos de *O. vulgare* e *O. majorana* apresentaram Gamma-Terpinene, 4-Terpineol e Alpha-Terpinene como componentes majoritários, e cineole, Alpha-Pinene e Camphor em *R. officinalis*.
- Na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ os óleos essenciais de *O. vulgare* e *O. majorana* não ocasionaram alterações na cinética espermática pelo CASA, havendo alterações em todos parâmetros à partir de 40 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$.
- Na citometria, na concentração de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ não houve alteração significativa nos parâmetros celulares, apenas alterações em DIF e FV para *O. majorana* em 24hs. A fluidez (FT e FV), LPO e DIF não foram alterados pela adição de *O. vulgare* nas diferentes concentrações e tempo de exposição. *O. majorana* à partir de 20 $\mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$ modificou todos os parâmetros, independente do tempo de exposição, sugerindo toxicidade maior deste.

Referências

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 Zootecia 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.

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.

AMANN, R.; KATZ, D.F. Reflections on CASA after 25 years. **J Androl**, v.25, p.317-325, 2004.

ANDERSSON, M.C.; MIKKOLA, R.; KOTIAHO, M.; HOORNSTRA, D.; ANDERSSON, M.A.; SALKINOJA- SALONEN, M. Boar spermatozoa as a tool in toxicological research, a novel application for extended boar semen commercially produced by AI stations. **Reproduction in Domestic Animals**, v.41, n.4, p.303-303, 2006.

ANDERSSON, M.A.; MIKKOLA, R.; RASIMUS, S.; HOORNSTRA, D.; SALIN, P.; RAHKILA, R.; HEIKKINEN, M.; MATTILA, S.; PELTOLA, J.; KALSO, S.; SALKINOJA-SALONEN, M. Boar spermatozoa as a biosensor for detecting toxic substances in indoor dust and aerosol. **Toxicology In Vitro**, v.24, n.7, p.2041–2052, 2010.

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

ARAIS, L. R. **Resistência aos antimicrobianos, pesquisa de exotoxinas e relação genética de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de otite externa e piodermite canina.** 2013. 105f. Tese (Doutorado em Clínica e Reprodução Animal)-Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013.

ARIAS, M. V. B. et al. Identificação da suscetibilidade antimicrobiana de bactérias 9 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.

BAMPIDIS, V. A.; CHRISTODOULOU, V.; FLOROU-PANERI, P.; et al. Effect of dietary dried oregano leaves on growth performance, carcass characteristics and serum cholesterol of female early maturing turkeys. **British Poultry Science**, v. 46, n. 5, p. 595–601, 2005.

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, 2009.

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.

BAYDAR, H.; SAĞDIÇ, O.; ÖZKAN, G.; KARADOĞAN, T. Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. **FoodControl**, v. 15, n. 3, p. 169–172, 2004.

BEDNARCZUK, V.O.; VERDAM, M.C.S.; MIGUEL, M.D.; MIGUEL, O.G. Teste in vitro e in vivo utilizados na triagem toxicológica de produtos naturais. **Visão 29 Acadêmica**, v.11, n.2, p.43-50, 2010.

BLANK, D. **Investigação da citotoxicidade e atividade anti-viral dos extratos de plantas da família Lamiaceae.** 2013. 84f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013

BLANK, D. E.; Hörnke, A. G.; ; FREITAG, R. A. ; CORRÊA, R. A. ; HÜBNER, S. O. 5 ; CLEFF, M. B. Composição química e citotoxicidade de *Origanum vulgare* L. e *Rosmarinus officinalis* L. **Science and animal health**. v.4 n.2. p. 117-130,2016.

BONES, V. C.; MOLETO, C. F. M. Alternativas ao uso de animais de laboratório no Brasil. **Veterinária em Foco**, v.10, n.1, p.103-112, 2012.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopéia Brasileira. Brasília: **ANVISA**, 2011. 126p.

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.

CELIK TAS, O.Y. et al. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chemistry**, n. 1, v. 100, p. 553-9, 2007.

CLEFF, M. B. **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.

CHORIANOPOULOS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; ALIGIANNIS, N.; et al. Essential Oils of *Satureja*, *Origanum*, and *Thymus* Species: Chemical Composition and Antibacterial Activities Against Foodborne Pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 26, p. 8261–8267, 2004.

CLSI. Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Approved Standard—Eighth Edition. **CLSI document M100.** Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2019.

COLARES, K.T.; ANDRADE, A.F.; ATHAYDE, L. A. Ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistente em unidade de tratamento intensivo: uma revisão. **RBAC**. 2016;48(3 supl.1):15-9.

COSTA, D. M. L. Ototoxicidade dos antibióticos aminoglicosídeos e sistema eferente: comparação entre a administração aguda e crônica com a gentamicina e os efeitos agudos de outros antibióticos. **Revista Hospital das Clínicas de Porto Alegre**, 19: 186-196, 1999.

COSTA, A. C. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *O. vulgare* L. e *Cinnamomum zeylanicum* B. contra bactérias multirresistentes.** 98f. 2009. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal da Paraíba, 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.

DOMÍNGUEZ-REBOLLEDO, A.E.; MARTÍNEZ-PASTOR, F.; BISBAL, A.F.; ROS-SANTAELLA, J.L.; GARCÍA-ÁLVAREZ, O.; MAROTO-MORALES, A.; SOLER, A.J.; GARDE, J.J.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R. Response of thawed epididymal spermatozoa to increasing concentrations of hydrogen peroxide, and importance of individual male variability. **Reproduction in Domestic Animals**, v.46, n.3, p.393-403, 2011.

EVENSON, D.; JOST, L. Sperm chromatin structure assay: DNA denaturability. **Methods in Cell Biology**, v.42, p.159-176, 1994.

FERNANDEZ-GAGO, R.; DOMINGUEZ, J.C.; MARTINEZ-PASTOR, F. Seminal plasma applied post-thawing affects boar sperm physiology: a flow cytometry study. **Theriogenology**, v.80, n.4, p.400-410, 2013.

FERREIRA, L. L. **Estrutura clonal e multirresistência em *Pseudomonas aeruginosa***. 2005. 114 f. Dissertação em Vigilância Sanitária, Prog. Pós-Graduação em Vigilância Sanitária Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro, 2005.

FERREIRA, H.; GARCIA, L. B.; CARRARA-MARRONE, F. E.; TOGNIM, M. C. B.; CARDOSO, C. L. Susceptibilidade de amostras clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* a antibióticos e a clorexidina. **Rev Epidemiol Control Infect.** 2014;4(4):243-248.

FERRAREZE, M.V.G.; LEOPOLDO, V.C.; ANDRADE, D.; SILVA, M.F.I. HAAS, V.J. *Pseudomonas aeruginosa* multiresistente em unidade de cuidados intensivos: desafios que procedem? **Acta Paul Enferm** 2007;20(1):7-11.

FRITZSCHE, M.; MANDENIUS C. Fluorescent cell-based sensing approaches for toxicity testing. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v.398, n.1, p.181-191, 2010.

GALES, A. C.; MENDES, R.; RODRIGUES, J.; SADER, H.S. Comparação das atividades antimicrobianas de meropenem e imipenem/cilastatina: o laboratório necessita testar rotineiramente os dois antimicrobianos? **J. Bras. Patol. Med.Lab.** vol.38 no.1 Rio de Janeiro Jan. 2002.

GHELLER, B. G.; MEIRELLES, A. C. F.; PAULO TADEU F.; HOLSBACH, V. Patógenos bacterianos em cães com otite externa e seus perfis de suscetibilidade a diversos antimicrobianos. **PUBVET** v.11, n.2, p.159-167, Fev., 2017.

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

GIORDANI, C. **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.

GIORDANI, Claudia. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e toxicidade em modelos alternativos**. 2017. 150f. Tese (Doutorado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

GONÇALVES, M.J., CRUZ, M.T., CAVALEIRO, C., LOPES, M.C., SALGUEIRO, L. **Industrial Cropsand Products**32 , 70–75, 2010.

GREEN, C.L.; BROWN, L.; STEWART, J.J.; XU, Y.; LITWIN, V.; MC CLOSKEY, T.W. Recommendations for the validation of flow cytometric testing during drug development: I instrumentation. **Journal of Immunological Methods**, v.363, n.2, p.104–119, 2011.

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.

HAJLAOUI, H.; MIGHRI, H.; AOUNI, M.; GHARSALLAH, N.; KADRI, A. Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanummajorana*L. essential oil. **Microbial Pathogenesis**, v.95, p.86-94, 2016.

HANCOCK, R.E.W. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative Gram negative bacteria. **Clin Infect Dis**, v. 27, p. S93-99, 1998.

HARAYASHIKI, C.A.Y., JUNIOR, A.S.V., MACHADO, A.A.S., CABRERA, L.C., PRIMEL, E.G., BIANCHINI, A., CORCINI, C.D., Toxic effects of the herbicide Round up in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. **Aquatic Toxicology** (2013).

HARTWIG, F.P.; PAPA, F.O.; DELL'AQUA JUNIOR, J. Utilização do colesterol na criopreservação de espermatozoides na espécie equina: Uma revisão. **Veterinária e Zootecnia**, v.19, n.2, p.157-168, 2012.

HASSAN, A.M.; ABDEL-AZIEM, S.H.; EL-NEKEETY, A.A.; ABDEL-WAHHAB, M.A. *Panax ginseng* extract modulates oxidative stress, DNA fragmentation and up-regulate gene expression in rats sub chronically treated with aflatoxin B1 and fumonisin B1. **Cytotechnology**, v.67, n.5, p.861-871, 2015.

HOSSAIN, M.S.; JOHANNISSONA, A.; WALLGRENA, M.; NAGY, S.; SIQUEIRA, A.P.; RODRIGUEZ-MARTINEZ, H. Flow cytometry for the assessment of animal sperm integrity and functionality: State of the art. **Asian Journal of Andrology**, v.13, n.3, p.406-419, 2011.

KOHL, T; PONTAROLO, G. H.; PEDRASSANI, D. Resistência antimicrobiana de bactérias isoladas de amostras de animais atendidos em hospital veterinário. **Saúde Meio Ambiente**. v. 5, n. 2, p. 115-127, jul./dez. 2016.

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.

LAM, L. K. T.; ZHENG, G. Q. Potential anticarcinogenic natural products isolated from lemongrass oil and galanga root oil. **J. Agric. Food Chem.**, 1993, 41 (2), pp 153–156

LAMBERT, P. A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram positive bactéria and mycobacteria. **J. Appl. Microbiol.**, Bedford-UK, v. 92, p. 46S-54, 2002.

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

LIU, Z.; LI, Z., LIU, X. Effect of ginsenoside Re on cardiomyocyte apoptosis and expression of Bcl-2/Bax gene after ischemia and reperfusion in rats. **J. Huazhong University of Science and Technology**, v.22, n.4, p.305–309, 2002.

LUQMAN, S.; DWIVEDI, G. R.; DAROKAR, M. P.; KALRA, A.; KHANUJA, S. P. Potential of rosemary oil to be used in drug-resistant infections. **Altern Ther Health Med**, St Paul-Minnesota, v. 13, n. 5, p. 54-59, 2007.

MACHADO, B. F. M. T. **Óleos essenciais: verificação da ação antimicrobiana in vitro, na água e sobre a microbiota da pele humana**. 20111111 f. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2011.

MAHMOUD, T.S.; MARQUES, M.R.; PESSOA, C.O. et al. In vitro cytotoxic activity of Brazilian Middle West plant extracts. *Rev. bras. farmacog.*, v.21, n.3, p.456-464, 2011.

MALO, C.; GIL, L.; CANO, R.; GONZALEZ, N.; LUÑO, V. Fennel (*Foeniculumvulgare*) provides antioxidante protection for boar semen cryopreservation. **Andrologia**, v.44 (Suppl 1), p.710-715, 2012.

MALO, C.; GIL, L.; CANO, R.; MARTÍNEZ, F.; GALÉ, I. Antioxidant effect of rosemary (*Rosmarinusofficinalis*) on boar epididymal spermatozoa during cryopreservation. **Theriogenology**, v.75, p.1735-1741, 2011.

MALO, C.; GIL, L.; GONZALEZ, N.; MARTÍNEZ, F.; CANO, R.; BLAS, I.; ESPINOSA, E. Anti-oxidant supplementation improves boar sperm characteristics and fertility after cryopreservation: Comparison between cysteine and rosemary (*Rosmarinus officinalis*). **Cryobiology**, v.61, p.142–147, 2010.

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

MANOLIS N. SARIDOMICHELAKIS, M. N.; FARMAKI, R.; LEONIDAS S. LEONTIDES, L.S.; KOUTINAS, F. A.A etiology of canine otitis externa: a retrospective study of 100 cases. **Journal compilation**. V. **18**; p 341–347, 2007.

MANTESE, O.C. Pneumococo resistente à penicilina: implicações práticas. *Jornal de Pediatria*, v.75, Supl.1, p.S74-S90, 1999.

MARTINEZ-ALBORCIA, M.J.; MORRELL, J.M.; GIL, M.A.; BARRANCO, I.; MASIDE, C.; ALKMIN, D.V.; PARRILLA, I.; MARTINEZ, E.A.; ROCA, J. Suitability and effectiveness of single layer centrifugation using Androcoll-P in the cryopreservation protocol for boar spermatozoa. **Animal Reproduction Science**, v.140, n.3-4, p.173-179, 2002.

MARTINEZ-PASTOR, F.; MARTÍNEZ, F.; GARCÍA-MACÍAS, V.; ESTESO, M.C.; ANEL, E.; FERNÁNDEZ-SANTOS, M.R.; SOLER, A.J.; DE PAZ, P.; GARDE, J.; ANEL, L. A pilot study on post-thawing quality of Iberian red deer spermatozoa (epididymal and electroejaculated) depending on glycerol concentration and extender osmolality. **Theriogenology**, v.66, n.5, p.1165–1172, 2006.

MARTINS, E.A.; MOMESSO, C. S.; NARDO, C.D.D.; CASTRO, K.F.; ATIQUÉ, T.S.C.; NETTO, H.A.; FURINI, A.A.C. Estudo clínico e microbiológico de otite externa

de cães atendidos em hospital veterinário do noroeste paulista. **Acta Veterinaria Brasilica**, v.5, n.1, p.61-67, 2011.

MATA, P. T. G.; ABEGG, M. A. **Descrição de caso de resistência a antibióticos por *Pseudomonas aeruginosa***. Arq Mudi. 2007;11(2):20-25.

MATOS, C.B., MADRID, I.M.; SANTIN, R.; AZAMBUJA, R.H.; SCHUCH, I.; MEIRELES, M.C.A.; CLEFF, M.B. Dermatite multifatorial em um canino. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.64, n.6, p.1478-1482, 2012.

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.

MEIRELES, M. A. O. M. **Uso de antimicrobianos e resistência bacteriana: aspectos socioeconômicos e comportamentais e seu impacto clínico 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. **Detecção 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.

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.

MORAES, T. B. ; AZAMBUJA, R. H. M. ; ANANA, D. C. ; ANANA, D. C. ; STELMAKE, L. L. ; BATISTA, M. S. ; LAVADOURO, J. H. B. ; CLEFF, M.B. . Casuística de doenças tegumentares no Ambulatório Ceval-UFPeI. **Anais do 41º Congresso Brasileiro de Medicina Veterinária**, Gramado, 2014.

MONTON, A.; GIL, L.; MALO, C.; OLACIREGUI, M; GONZALEZ ,N.; BLAS, I. Sage (*Salvia officinalis*) and fennel (*Foeniculumvulgare*) improve cryopreserved boarepididymal semen quality study. **Cryo Letters**, v.36, n.2, p.83-90, 2015.

MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, v.60, n.2, p.33-36, 2008.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **J ImmunolMethods**, v.65, p.55-63, 1983.

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. OLIVEIRA et al., 2006.

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.

MUELLER, E. N.; GUIOT, E G.; SANTIN, R.; MEIRELES, M. C. A.; SCHUCH, L. F. D.; NOBRE, M. O.. Efeito auxiliar do ceruminolítico na terapia tópica de cães (*Canis lupus familiaris*) com otite externa ceruminosa. **Ci. Anim. Bras.**, Goiânia, v.14, n.1, p. 59-64, jan./mar. 2013.

NAKAGAWA, K.; YAMANO, S.; KAMADA, M.; MAEGAWA, M.; TOKUMURA, A.; IRAHARA, M.; SAITO, H. Sperm-immobilizing antibodies suppress an increase in the plasma membrane fluidity of human spermatozoa. **Fertility and Sterility**, v.83, p.1054-1058, 2004.

NETO, S.A.; LOPES, C.M. (2015)- Estudo retrospectivo da ocorrência, sensibilidade e resistência antimicrobiana *in vitro* em otopatias caninas na região da grande Florianópolis – SC. **Revista de Educação Continuada em Medicina Veterinária e Zootecnia do CRMV-SP**, v. 13, n. 3, 2015.

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, R. A. G.; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA-FILHO, R. N. Estudo da

interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 16(1): 77-82, 2006.

OLIVEIRA, V. B. et al. Etiologia, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e aspectos epidemiológicos na otite canina: estudo retrospectivo de 616 casos **Semina: Ciências Agrárias, Londrina**, v. 33, n. 6, p. 2367-2374, nov./dez. 2012.

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.

ORTEGA-FERRUSOLA, C., GARCIA, B.M., GALLARDO-BOLAÑOS, J.M., GONZALEZ-FERNANDES, L., RODRÍGUEZ-MARTINEZ, H., TAPIA, J.A., PEÑA, F.J., 2009. Apoptotic markers can be used to forecast the freeze ability of stallion spermatozoa. **Anim. Reprod. Sci.** 114, 393-403.

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 FERRAREZE et. al, 2006.

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.

PERERA, S.C. **Identificação de ovos de *Diectophyma renale* no ambiente e na urina de cães e gatos de Pelotas, e avaliação in vitro de extratos vegetais da família Lamiaceae sobre os ovos do nematódeo.** 2016. 80 f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Bioquímica e Bioprospecção, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

REICHLING, J.; SCHNITZLER, P.; SUSCHKE, U.; SALLER, R. Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties – an overview. *Forschende Komplementärmedizin*, v.16, p.79-90, 2009.

RIBEIRO, D. S. **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.

RIBEIRO, D. S.; MELO, D. B.; GUIMARÃES, A. G.; VELOZO, E. S. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. *Semina: Ciências Agrárias*, Londrina, v. 33, n. 2, p. 687-696, abr. 2012.

RIBEIRO, A. M. F. **Farmacologia dos antibióticos Aminoglicosídeos.** 2017. 72f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)- Faculdade de Farmácia, Universidade Fernando Pessoa.

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

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.

ROTA, A.; BASTIANACCI, V.; MAGELLI, C.; PANZANI, D.; CAMILLO, F. Evaluation of plasma membrane integrity of donkey spermatozoa. **Reproduction in Domestic Animals**, v.45, p.228–232, 2010.

RIBEIRO, D. S.; MELO, D. B.; GUIMARÃES, A. G.; VELOZO, E. S. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 687-696, abr. 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, A.S.L.M.O. **Estudo da resistência às cefalosporinas de terceira geração de isolados de *Escherichia coli* de origem canina.** 2011. 81f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Técnica de Lisboa.

SANTIN, R. **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.

SANTOS, F.L.; SANTOS, B.I.A.M.L.; XAVIER, D.E. Determinação da produção de metalo- β -lactamases em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas. **J Bras Patol Med Lab.** 2002;38(4):291-6.

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.

SERGEANT, O.; PEREIRA, M.; BELHOMME, C.; CHEVANNE, M.; HUC, L.; LAGADIC-GOSSMANN, D. Role for membrane fluidity in ethanol-induced oxidative stress of primary rat hepatocytes. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v.313, p.104–111, 2005.

SIERRA-VALDEZ, F. J.; FORERO-QUINTERO, L. S.; ZAPATA-MORIN, P. A.; COSTAS, M.; CHAVEZ-REYES, A.; RUIZ-SUÁREZ, J. C. The Influence of Non Polar and Polar Molecules in Mouse Motile Cells Membranes and Pure Lipid Bilayers. **PLOS ONE**, v.8, n.4, p.1-6, 2013.

SILVA, Mayara Gobetti Fernandes. **Atividade antioxidante e antimicrobiana *in vitro* de óleos essenciais e extratos hidroalcolólicos 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.

SILVA, E.C.B., CAJUEIRO, J.F.P., SILVA, S.V. et al. Effect of antioxidants 1 resveratrol and quercetin on *in vitro* evaluation of frozen ram sperm. **Theriongelonogy**, v.77, p.1722-1726, 2012.

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, C. C. **Estudo retrospectivo de melanomas cutâneos caninos e determinação da atividade citotóxica de produtos vegetais frente a células neoplásicas (B16F10) e não neoplásicas (MDBK)**. 2016. 88f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2016.

SILVA, D.A.C.M. **Epidemiologia molecular de estirpes bacterianas multirresistentes: *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus***. 2016. 98f. Dissertação (Mestrado em Ciências

Farmacêuticas) - Instituto superior de ciências da saúde Egas Moniz, Almada, Portugal, 2016.

SILVA, L.C. A.; PESSOA, D.A.N., L.A.; MAIA, R .A.T; MATOS & M.M.S. MACÊDO. Systemic Infection by *Pseudomonas aeruginosa* in a Dog. **Acta Scientiae Veterinariae**. 44(Suppl 1): 164.2016.

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.

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, A. V. G.; SALERNO, T.; SIQUEIRA, A. K.; RIBEIRO, M. G.; PAES, A. C.; LISTONI, F. J. P. **Perfil de sensibilidade microbiana em 135 linhagens de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de cães com otite**. In: REUNIÃO ANUAL DO INSTITUTO BIOLÓGICO DE SÃO PAULO, São Paulo. 2006.

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.

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.

TUNON, G I. L.; SILVA, E. P.; FAIERSTEIN, C. C. Isolamento de estafilococos multirresistentes de otites em cães e sua importância para a saúde pública. **BEPA, Bol. epidemiol. paul. (Online)** vol.5 no.58 São Paulo out. 2008.

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.

VICENTE-CARRILLO, A.; EDEBERT, I.; GARSIDE, H.; COTGREAVE, I.; RIGLER, R.; LOITTO, V.; MAGNUSSON, K.E.; RODRÍGUEZ-MARTÍNEZ, H. Boar spermatozoa successfully predict mitochondrial modes of toxicity: Implications for drug toxicity testing and the 3R principles. **Toxicology In Vitro**, v.29, n.3, p.582-591, 2015.

VIEIRA, J. M. C. **Tratamento da pododermite 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.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. Óleo essencial de eucalipto. **Documentos Florestais**, v. 17, p. 1- 26, 2003.

WALLER, S.B.; CLEFF, M.B.; SERRA, E.F.; SILVA, A.L.; GOMES, A.D.R.; DE MELLO, J.R.B.; DE FARIA, R.O.; MEIRELES, M.C.A.; Plants from Lamiaceae family as source of antifungal molecules in humane and veterinary medicine, **Microbial Pathogenesis**. 2017 Mar; 104:232-237.

WALLER, S. B. et al.. Polar *Origanum vulgare* (Lamiaceae) extracts with antifungal potential against *Sporothrix brasiliensis*. *Medical Mycology*. 2018 Feb 1;56(2):225-233.

ZAGO, J. A. A.; USHIMARU, P. I.; BARBOSA, L. N.; FERNANDES JUNIOR, A. Synergism between essential oils and antimicrobial drugs against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* strains from human infections. **Rev. Bras. Farmacogn.**, João Pessoa, v. 19, n. 4, p. 828-833, dec. 2009.

ZÖLLNER, T.; SCHWARZ, M. Herbal Reference Standards: applications, definitions and regulatory requirements. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.23, n.1, p.1-21, 2013.