

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO NORTE FLUMINENSE DARCY RIBEIRO

FERNANDA ENI FERRAZ RIBEIRO

ESTUDO DA ATIVIDADE DE *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, *Hibiscus sabdariffa* L. E DE HETEROPOLIÁCIDOS SOBRE MICRO-ORGANISMOS CAUSADORES DE OTITE CANINA

Campos dos Goytacazes

Dezembro – 2013

FERNANDA ENI FERRAZ RIBEIRO

ESTUDO DA ATIVIDADE DE *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, *Hibiscus sabdariffa* L. E DE HETEROPOLIÁCIDOS SOBRE MICRO-ORGANISMOS CAUSADORES DE OTITE CANINA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciência Animal.

Orientador: Olney Vieira da Motta

Campos dos Goytacazes

Dezembro – 2013

ESTUDO DA ATIVIDADE DE *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, *Hibiscus sabdariffa* L. E DE HETEROPOLIÁCIDOS SOBRE MICRO-ORGANISMOS CAUSADORES DE OTITE CANINA

FERNANDA ENI FERRAZ RIBEIRO

Dissertação de Mestrado apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, como requisito para obtenção do grau de mestre em Ciência Animal.

COMISSÃO EXAMINADORA:

SOLANGE SILVA SAMARÃO (Dra. Biociências e Biotecnologia - UENF)

MARCELO FRANCISCO DE ARAÚJO (Dr. Química – UFRRJ)

JOÃO CARLOS DE AQUINO ALMEIDA (Dr. Ciências Biológicas - UFRJ)

**OLNEY VIEIRA DA MOTTA (Dr. Biociências e Biotecnologia - UENF) –
ORIENTADOR**

Agradecimentos...

Aos meus pais, Silvio e Edna, por acreditarem no meu sonho e pelo amor incondicional.

Ao meu irmão Rafael e minha cunhada Gisele, por estarem presentes na minha vida.

Ao meu noivo Breno, pelo carinho, companheirismo e amor em todos os momentos. Pelas palhaçadas e risadas, que fizeram minha vida em Campos muito mais feliz.

Aos meus futuros sogros, Paulo e Lúcia, pelos conselhos e pelo carinho sempre presente.

Ao meu orientador Prof^o. Olney Vieira da Motta, pelo apoio, incentivo, grande colaboração e orientação neste trabalho.

A doutoranda Luciana da Silva Mathias, pela paciência, conhecimentos compartilhados e ajuda fundamental para realização deste trabalho, além da amizade e carinho.

Aos demais colaboradores Prof^a. Lanamar de Almeida Carlos (UFSJ), Prof^o. Ivo José Cursino Vieira (LCQUI/CCT/UENF) e Prof^o. Luís César Passoni (LCQUI/CCT/UENF), por terem cedido seus compostos para serem utilizados neste trabalho.

Ao Prof^o. João Carlos de Aquino Almeida (LFBM/CBB/UENF) pela ajuda na observação da microscopia eletrônica de transmissão.

As técnicas do PAM/LFBM/CBB/UENF pela ajuda com o preparo das amostras para microscopia.

A técnica de nível superior Solange Silva Samarão, pelas análises estatísticas e ensinamentos compartilhados.

A futura doutoranda Maria Fabíola Nunes Rangel, pela realização da análise de PCR das amostras, além é claro da amizade e muitas gargalhadas.

As técnicas de nível superior do LSA/CCTA/UENF, Gina e Maria de Lourdes, pela valiosa ajuda oferecida.

As colegas veterinárias, Ana Carolina Lima, Bethânia Falcão e Milene Bartolazi pela ajuda com as amostras clínicas.

Aos colegas de laboratório, Marcella, Malu, Luize, Luiz, Indiara, Bete e Mariane.

E a todos que fizeram parte da minha caminhada até aqui.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	01
2. JUSTIFICATIVA	03
3. OBJETIVOS	04
3.1. OBJETIVO GERAL	04
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	04
4. REVISÃO DE LITERATURA	05
4.1. OTITE CANINA.....	05
4.2. PRINCIPAIS MICRO-ORGANISMOS ENVOLVIDOS NAS OTITES CANINAS.....	07
4.2.1. <i>Malassezia pachydermatis</i>	07
4.2.2. <i>Staphylococcus</i> sp.	09
4.2.3. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
4.3. MICRO-ORGANISMOS MULTIRRESISTENTES AOS FÁRMACOS	13
4.4. DIAGNÓSTICO DA OTITE CANINA.....	18
4.5. TRATAMENTO DA OTITE EM CÃES.....	19
4.6. BIOFILMES EM OTITES	21
4.7. SUBSTÂNCIAS NATURAIS E SINTÉTICOS.....	24
4.7.1. <i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	24
4.7.2. <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	25
4.7.3. HETEROPOLIÁCIDOS (HPAS)	27
5. MATERIAL E MÉTODOS	29
5.1. MICRO-ORGANISMOS UTILIZADOS	29
5.2. PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS	30
5.3. ANÁLISE MOLECULAR - PCR DAS CEPAS DE <i>Staphylococcus</i> spp.....	31
5.4. SUBSTÂNCIAS TESTADAS.....	33
5.3.1. HETEROPOLIÁCIDOS (HPAS)	33
5.3.2. EXTRATOS DE <i>C. baccatum</i>	34
5.3.3. EXTRATO DE <i>H. sabdariffa</i> L.	34
5.5. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) - DILUIÇÃO EM CALDO	34
5.6. ENSAIO DE INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO COM OS HPAS	35

5.6.1. INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO EM TEMPO INICIAL DE CRESCIMENTO.....	35
5.6.2. INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO EM FASE EXPONENCIAL DE CRESCIMENTO.....	36
5.7. PERMEABILIZAÇÃO DAS MEMBRANAS.....	36
5.8. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET).....	36
5.9. MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	37
5.10. ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	38
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	39
6.1. PERFIL DE RESISTÊNCIA AOS ANTIMICROBIANOS DAS CEPAS ESTUDADAS.....	39
6.2. ANÁLISE MOLECULAR (PCR) DAS AMOSTRAS CLÍNICAS DE <i>Staphylococcus</i> spp.....	41
6.3. CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM) – DILUIÇÃO EM CALDO	43
6.3.1. CIM COM EXTRATOS DE <i>C. bacatum</i> E <i>H. sabdariffa</i> (EBHS) SOBRE <i>M. pachydermatis</i> (MP1).....	43
6.3.2. CIM COM EXTRATOS DE <i>C. bacatum</i> E <i>H. sabdariffa</i> (EBHS) SOBRE <i>S. aureus</i> ATCC33591.....	45
6.3.3. CIM COM EXTRATOS DE <i>C. bacatum</i> E <i>H. sabdariffa</i> (EBHS) SOBRE <i>S. pseudintermedius</i> (SP2).....	47
6.3.4. CIM COM EXTRATOS DE <i>C. bacatum</i> E <i>H. sabdariffa</i> (EBHS) SOBRE <i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	48
6.4. ENSAIOS DE INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO EM TEMPO INICIAL DE CRESCIMENTO.....	50
6.4.1. ENSAIO DE INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>M. pachydermatis</i> (MP1) NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS $AG_3[PMO_{12}O_{40}]$, $AG_3[PW_{12}O_{40}]$, $AG_4[SIW_{12}O_{40}]$ E $AG_4[SIW_{10}V_2O_{40}]$, NA CONCENTRAÇÃO 0,028 μ MOL/ML, ADICIONADOS NO TEMPO 0H.....	50
6.4.2. ENSAIO DE INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>S. aureus</i> ATCC33591 NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS $AG_3[PMO_{12}O_{40}]$, $AG_3[PW_{12}O_{40}]$, $AG_4[SIW_{12}O_{40}]$ E	

AG ₄ [SIW ₁₀ V ₂ O ₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML, ADICIONADOS NO TEMPO 0H.....	51
6.4.3. ENSAIO DE INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>S. pseudintermedius</i> (SP2) NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS AG ₃ [PMO ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PW ₁₂ O ₄₀], AG ₄ [SIW ₁₂ O ₄₀] E AG ₄ [SIW ₁₀ V ₂ O ₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML, ADICIONADOS NO TEMPO 0H.....	53
6.4.4. ENSAIO DE INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>P. aeruginosa</i> ATCC9027 NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS AG ₃ [PMO ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PW ₁₂ O ₄₀], AG ₄ [SIW ₁₂ O ₄₀] E AG ₄ [SIW ₁₀ V ₂ O ₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML, ADICIONADOS NO TEMPO 0H.....	54
6.5. ENSAIOS DE INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO EM TEMPO INICIAL DE CRESCIMENTO.....	56
6.5.1. ENSAIO DE INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>M. pachydermatis</i> (MP1) NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS AG ₃ [PMO ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PW ₁₂ O ₄₀], AG ₄ [SIW ₁₂ O ₄₀] E AG ₄ [SIW ₁₀ V ₂ O ₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML, ADICIONADOS NO TEMPO 36H.....	56
6.5.2. ENSAIO DE INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>S. aureus</i> ATCC33591 NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS AG ₃ [PMO ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PW ₁₂ O ₄₀], AG ₄ [SIW ₁₂ O ₄₀] E AG ₄ [SIW ₁₀ V ₂ O ₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML, ADICIONADOS NO TEMPO 3H.....	58
6.5.3. ENSAIO DE INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>S. pseudintermedius</i> (SP2) NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS AG ₃ [PMO ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PW ₁₂ O ₄₀], AG ₄ [SIW ₁₂ O ₄₀] E AG ₄ [SIW ₁₀ V ₂ O ₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML, ADICIONADOS NO TEMPO 4H.....	59
6.5.4. ENSAIO DE INIBIÇÃO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>P. aeruginosa</i> ATCC9027 NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS AG ₃ [PMO ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PW ₁₂ O ₄₀], AG ₄ [SIW ₁₂ O ₄₀] E AG ₄ [SIW ₁₀ V ₂ O ₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML, ADICIONADOS NO TEMPO 6H.....	61

6.6. PERMEABILIZAÇÃO DAS MEMBRANAS	65
6.6.1. <i>Malassezia pachydermatis</i> (MP1)	65
6.6.2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33591	67
6.6.3. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (SP2)	67
6.6.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	68
6.7. ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE TRANSMISSÃO (MET)	70
6.7.1. <i>Malassezia pachydermatis</i> (MP1)	70
6.7.2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33591	72
6.7.3. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (SP2)	73
6.7.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	74
6.8. ANÁLISE POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	76
6.8.1. <i>Malassezia pachydermatis</i> (MP1)	76
6.8.2. <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC33591	78
6.8.3. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> (SP2)	79
6.8.4. <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC9027	78
7. CONCLUSÕES	81
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

LISTA DE ABREVIATURAS

Ag₃[PW₁₂O₄₀]: Dodecatungstofosfato de Prata
Ag₃[PMo₁₂O₄₀]: Dodecamolibdofosfato de Prata
Ag₄[SiW₁₀V₂O₄₀]: Decatungstosilicato de Prata
Ag₄[SiW₁₂O₄₀]: Dodecatungstosilicato de Prata
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC: American Type Culture Collection
CIM: Concentração Inibitória Mínima
EbHs: Extrato bruto de *Hibiscus sabdariffa*
FDA: Food and Drug Administration
HPAs: Heteropoliácidos
MET: Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV: Microscopia Eletrônica de Varredura
MRSA: Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*
MRSP: Methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*
MSSA: Methicillin- sensitive *Staphylococcus aureus*
MSSP: Methicillin- sensitive *Staphylococcus pseudintermedius*
NCCLS: Manual Clinical and Laboratory Standards Institute
OMS: Organização Mundial de Saúde
PCR: Polymerase Chain Reaction

LISTA DE TABELAS

TABELA 1: ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚNGICOS UTILIZADOS NOS ANTIBIOGRAMAS E ANTIFUNGIGRAMAS PARA AVALIAÇÃO DO PERFIL DE RESISTÊNCIA.	31
TABELA 2: PERFIL DE RESISTÊNCIA DE <i>M. pachydermatis</i> AOS AGENTES ANTIFÚNGICOS PELO MÉTODO DIFUSÃO EM AGAR.....	39
TABELA 3: PERFIL DE RESISTÊNCIA DE <i>Staphylococcus</i> spp. AOS AGENTES ANTIBACTERIANOS PELO MÉTODO DIFUSÃO EM AGAR.....	40
TABELA 4: PERFIL DE RESISTÊNCIA DE <i>P. aeruginosa</i> AOS AGENTES ANTIBACTERIANOS PELO MÉTODO DIFUSÃO EM AGAR.....	41
TABELA 5: CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>M. pachydermatis</i> (MP1) NA PRESENÇA DE MICONAZOL, AG ₄ [SIW ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PMO ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PW ₁₂ O ₄₀] E AG ₄ [SIW ₁₀ V ₂ O ₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML, ADICIONADOS NO TEMPO 0H.....	51
TABELA 6: CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>S. aureus</i> ATCC33591 NA PRESENÇA DE MICONAZOL, AG ₄ [SIW ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PMO ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PW ₁₂ O ₄₀] E AG ₄ [SIW ₁₀ V ₂ O ₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML, ADICIONADOS NO TEMPO 0H.....	52
TABELA 7: CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>S. pseudintermedius</i> (SP2) NA PRESENÇA DE MICONAZOL, AG ₄ [SIW ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PMO ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PW ₁₂ O ₄₀] E AG ₄ [SIW ₁₀ V ₂ O ₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML, ADICIONADOS NO TEMPO 0H.....	54
TABELA 8: CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>P. aeruginosa</i> ATCC9027 NA PRESENÇA DE MICONAZOL, AG ₄ [SIW ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PMO ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PW ₁₂ O ₄₀] E AG ₄ [SIW ₁₀ V ₂ O ₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML, ADICIONADOS NO TEMPO 0H.....	56
TABELA 9: CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>M. pachydermatis</i> (MP1) NA PRESENÇA DE MICONAZOL, AG ₄ [SIW ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PMO ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PW ₁₂ O ₄₀] E AG ₄ [SIW ₁₀ V ₂ O ₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML, ADICIONADOS NO TEMPO 36H.....	57
TABELA 10: CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO DE <i>S. aureus</i> ATCC33591 NA PRESENÇA DE MICONAZOL, AG ₄ [SIW ₁₂ O ₄₀], AG ₃ [PMO ₁₂ O ₄₀],	

AG₃[PW₁₂O₄₀] E AG₄[SIW₁₀V₂O₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML,
ADICIONADOS NO TEMPO 3H.....59

TABELA 11: CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO DE *S. pseudintermedius*
(SP2) NA PRESENÇA DE MICONAZOL, AG₄[SIW₁₂O₄₀], AG₃[PMO₁₂O₄₀],
AG₃[PW₁₂O₄₀] E AG₄[SIW₁₀V₂O₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML,
ADICIONADOS NO TEMPO 4H.....61

TABELA 12: CRESCIMENTO EM MEIO LÍQUIDO DE *P. aeruginosa*
ATCC9027 NA PRESENÇA DE MICONAZOL, AG₄[SIW₁₂O₄₀], AG₃[PMO₁₂O₄₀],
AG₃[PW₁₂O₄₀] E AG₄[SIW₁₀V₂O₄₀], NA CONCENTRAÇÃO 0,028μMOL/ML,
ADICIONADOS NO TEMPO 6H.....63

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1: DIVISÃO ANATÔMICA DO OUVIDO DO CÃO.....	5
FIGURA 2: LEVEDURA <i>Malassezia pachydermatis</i>	8
FIGURA 3: <i>Staphylococcus</i> sp.	9
FIGURA 4: <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	12
FIGURA 5: <i>Capsicum baccatum</i> var. <i>pendulum</i>	24
FIGURA 6: <i>Hibiscus sabdariffa</i> L.....	26
FIGURA 7: RESULTADO DO GEL DE AGAROSE PARA AMPLIFICAÇÃO DO GENE <i>mecA</i> DAS CEPAS DE <i>Staphylococcus</i> spp. ESTUDADAS	42
FIGURA 8: CRESCIMENTO DE COLÔNIAS DE <i>M. pachydermatis</i> (MP1) APÓS 48H DE INCUBAÇÃO PARA AVALIAR A CIM DOS EXTRATOS BRUTOS	44
FIGURA 9: CRESCIMENTO DE COLÔNIAS DE <i>S. aureus</i> ATCC33591 APÓS 12H DE INCUBAÇÃO PARA AVALIAR A CIM DOS EXTRATOS BRUTOS	46
FIGURA 10: CRESCIMENTO DE COLÔNIAS DE <i>S. pseudintermedius</i> (SP2) APÓS 12H DE INCUBAÇÃO PARA AVALIAR A CIM DOS EXTRATOS BRUTOS	47
FIGURA 11: CRESCIMENTO DE COLÔNIAS DE <i>P. aeruginosa</i> ATCC9027 APÓS 12H DE INCUBAÇÃO PARA AVALIAR A CIM DOS EXTRATOS BRUTOS	49
FIGURA 12: CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>M. pachydermatis</i> (MP1) NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS ADICIONADOS NO T0H.....	50
FIGURA 13: CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>S. aureus</i> ATCC33591 NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS ADICIONADOS NO T0H.....	52
FIGURA 14: CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>S. pseudintermedius</i> (SP2) NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS ADICIONADOS NO T0H.....	53
FIGURA 15: CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>P. aeruginosa</i> ATCC9027 NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS ADICIONADOS NO T0H.....	55
FIGURA 16: CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>M. pachydermatis</i> (MP1) NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS ADICIONADOS NO T36H.....	57
FIGURA 17: CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>S. aureus</i> ATCC33591 NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS ADICIONADOS NO T3H.....	58

FIGURA 18: CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>S. pseudintermedius</i> (SP2) NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS ADICIONADOS NO T4H	60
FIGURA 19: CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>P. aeruginosa</i> ATCC9027 NA PRESENÇA DOS SAIS DE HPAS ADICIONADOS NO T6H	62
FIGURA 20: MOF DE <i>M. pachydermatis</i> (MP1)	66
FIGURA 21: MOF DE <i>S. aureus</i> ATCC33591	67
FIGURA 22: MOF DE <i>S. pseudintermedius</i> (SP2)	68
FIGURA 23: MOF DE <i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	69
FIGURA 24: MET DE <i>M. pachydermatis</i> (MP1)	71
FIGURA 25: MET DE <i>S. aureus</i> ATCC33591	72
FIGURA 26: MET DE <i>S. pseudintermedius</i> (SP2).....	74
FIGURA 27: MET DE <i>P. aeruginosa</i> ATCC9027.....	75
FIGURA 28: MEV DE <i>M. pachydermatis</i> (MP1)	77
FIGURA 29: MEV DE <i>S. aureus</i> ATCC33591	78
FIGURA 30: MEV DE <i>S. pseudintermedius</i> (SP2)	80
FIGURA 31: MEV DE <i>P. aeruginosa</i> ATCC9027	81

RESUMO

Na rotina da prática veterinária os problemas dermatológicos estão entre os mais importantes na clínica de pequenos animais. A otite externa é uma patologia comumente observada em cães e gatos encaminhados à clínica veterinária. Os micro-organismos mais comumente relacionados a essa patologia são *Malassezia pachydermatis*, *Staphylococcus aureus*, *S. pseudintermedius* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os inúmeros relatos de micro-organismos multirresistentes, assim como cepas de grande importância, como *S. aureus* e *S. pseudintermedius* resistentes a meticilina, e também a capacidade desses micro-organismos se organizarem na forma de biofilmes, justificam a necessidade da descoberta de compostos com atividade antimicrobiana. Ensaio com extratos de plantas, *Hibiscus sabdariffa* (EbHs) e *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, foram realizados em meio líquido para avaliar a atividade antimicrobiana, assim como sua concentração inibitória mínima, confirmado por plaqueamento em meio sólido. Testes com novas formulações de substâncias sintéticas conhecidas como heteropolíácidos (HPAs) foram conduzidos em meio líquido para avaliar o crescimento dos micro-organismos medidos através da densidade óptica. Para *M. pachydermatis* a CIM de EbHs foi de 3,15mg/mL, e contra bactérias foi de 5,3mg/mL. Para a levedura, os extratos de *C. baccatum* apresentaram CIM de 20mg/mL, e para as bactérias, a máxima concentração disponível (25mg/mL) não apresentou atividade inibitória. Os tratamentos indicam grande potencial de três HPAs, $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$, $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$, $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$. Na análise por microscopia ótica de fluorescência, com SYTOX® Green, foi observado que todos os compostos que apresentaram atividade foram capazes de permear a membrana celular, permitindo que o corante penetrasse na célula. Na análise por microscopia eletrônica de varredura foi observado que todos os compostos que apresentaram atividade impediram a formação de biofilme em *M. pachydermatis*, *S. aureus* e *S. pseudintermedius*. Em *P. aeruginosa* apenas o HPA $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$ foi capaz de impedir a formação do biofilme. Na microscopia eletrônica de transmissão foi observado diversas alterações nas células após os tratamentos, principalmente sobre a parede celular, que na maioria dos tratamentos se encontrava rompida. Portanto, os resultados obtidos revelam o grande potencial do EbHs e dos HPAs sobre *M. pachydermatis*, *S. aureus*, *S. pseudintermedius* e *P. aeruginosa*; e dos extratos de *C. baccatum* sobre *M. pachydermatis*.

Palavras-chave: zoonoses, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Malassezia pachydermatis*, microscopia eletrônica, biofilme.

ABSTRACT

In veterinary practice routine skin problems are among the most important in small animal clinic. External otitis is a condition commonly seen in dogs and cats referred to the veterinary clinic. The microorganisms most commonly associated with this pathology are *Malassezia pachydermatis*, *Staphylococcus aureus*, *S. pseudintermedius* and *Pseudomonas aeruginosa*. The numerous reports of multidrug-resistant microorganisms and strains of importance such as methicillin resistant *S. aureus* and *S. pseudintermedius*, together with their ability to produce biofilms, justify the need for the discovery of compounds with antimicrobial activity. Trials with plant extracts, *Hibiscus sabdariffa* (EbHs) and *Capsicum baccatum* var. *pendulum*, were performed in liquid medium to evaluate the antimicrobial activity as well as minimal inhibitory concentration confirmed by solid medium culture. Tests with new formulations of synthetic molecules known as heteropolyacids (HPAs) have been conducted in a liquid medium to assess the growth of microorganisms measured by optical density. To *M. pachydermatis* EbHs the MIC was 3,15mg/mL, and against bacteria 5,3mg/mL. For yeast extracts *C. baccatum* showed MIC 20mg/mL, for bacteria the maximum concentration available (25mg/mL) showed no inhibitory activity. Treatments indicate great potential of three HPAs $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, and $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$. Analysis by fluorescence optical microscopy with SYTOX® Green, we observed that all compounds that showed activity were able to permeate the cell membrane, permeation of active compounds. Analysis by scanning electron microscopy results showed that all compounds presented activity preventing biofilm formation in *M. pachydermatis*, *S. aureus* and *S. pseudintermedius*. Differently, in *P. aeruginosa* only the HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ was able to prevent biofilm formation. Images of transmission electron microscopy showed several changes on treated cells, where most treatments were able to rupture cell wall and cytoplasm disorder. Therefore, the results show the great potential of EbHs and HPAs on *M. pachydermatis*, *S. aureus*, *S. pseudintermedius* and *P. aeruginosa*, and extracts of *C. baccatum* on *M. pachydermatis*.

Keywords: zoonosis, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Malassezia pachydermatis*, electron microscopy, biofilm.

1. INTRODUÇÃO

Na clínica de pequenos animais, as otites constituem um dos principais motivos de consultas a médicos veterinários. As frequências de apresentação em cães variam de 4,8 a 16,5%, porém a incidência de otite externa detectada durante o exame clínico destes cães aumenta para 16 a 25%, estando presente em animais apresentados ao clínico também com outras patologias (GRONO, 1984; HARVEY et al., 2004).

Sabe-se que a microbiota normal do conduto auditivo externo canino, constituída por *Staphylococcus* sp, *Bacillus* sp e *Malassezia pachydermatis*, altera-se em otopatas (AUGUST, 1993). No cão otopata, *Staphylococcus pseudintermedius* é a principal bactéria isolada, seguida por *Staphylococcus aureus* (COLE et al., 1998; LILENBAUM et al., 2000). Já *M. pachydermatis* é uma levedura isolada de meato acústico externo hígido assim como inflamado, pois prolifera quando o ambiente do meato acústico sofre alterações que permitem o seu desenvolvimento seletivo (HARVEY et al., 2004). Dentre os bacilos Gram-negativos não fermentadores, os diferentes gêneros de *Pseudomonas* são os mais frequentemente isolados na otite externa (NOBRE et al., 2001; GINEL et al., 2002), destacando-se a espécie *P. aeruginosa*.

Atualmente a medicina moderna está se deparando com o crescimento de infecções relacionadas aos biofilmes, definidos como comunidades microbianas duráveis embebidas em uma matriz polissacarídea (COSTERTON et al, 1995). As bactérias não estão sozinhas na formação de biofilmes, pois os fungos também o formam ou dele participam, sendo altamente resistente aos antifúngicos (RAMAGE et al., 2005). Assim sendo, a formação de biofilme pode ser um fator importante na etiologia da otite e suas complicações (POST, 2001; EHRLICH et al., 2002; FERGIE et al., 2004).

Um dos principais desafios do tratamento das otites caninas consiste em evitar sua cronicidade, que comumente se desenvolve devido ao uso empírico de antibacterianos e antifúngicos (DICKSON; LOVE, 1983; DIECKMANN et al., 1996). A inflamação crônica do canal auditivo leva ao desenvolvimento de fatores perpetuadores da otite, os quais podem causar o fracasso da terapia (MURPHY, 2001). Além disso, o tratamento é prolongado e, se mal empregado, pode favorecer a resistência microbiana.

Apesar da alta tecnologia e investimentos das indústrias farmacêuticas na produção de antimicrobianos cada vez mais potentes, é crescente a resistência microbiana (OLIVEIRA et al., 2005). O uso de componentes de plantas com fins terapêuticos vem aumentando no Brasil e no mundo, e de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estas poderão ser a melhor fonte para se obter uma variedade de drogas (NOGUEIRA et al., 2008).

Medicamentos baseados em produtos naturais correspondem à quase 70% de todos os fármacos aprovados pela *Food and Drug Administration* (FDA) para tratamento de doenças infecciosas e anticâncer (OJIMA, 2008; NEWMAN, 2007). Substâncias bioativas isoladas das pimentas do gênero *Capsicum* podem representar um valioso recurso contra micro-organismos patogênicos para o homem e animais. *Hibiscus sabdariffa* também tem sido amplamente utilizada na parte sul-ocidental da Nigéria para o tratamento de doenças cardíacas e hepáticas (ODIGIE et al., 2003).

Além disso, novas substâncias sintéticas orgânicas e inorgânicas, juntamente com a química combinatória, representam uma nova estratégia na busca de novos fármacos, promovendo uma autêntica revolução na forma de concepção praticada pela indústria farmacêutica (VIEGAS et al., 2006; YUNES; CECHINEL FILHO, 2001). Nesse contexto, moléculas inorgânicas conhecidas como heteropoliácidos (HPAs) podem representar uma nova classe de compostos com diferentes atividades biológicas de acordo com os metais presentes em suas estruturas.

Na busca por novos medicamentos, muitos estudos vêm sendo realizados com diferentes compostos, tanto naturais como sintéticos. O objetivo principal deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* de HPAs e extratos brutos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum* e de *H. sabdariffa* frente aos principais micro-organismos causadores de otite em cães.

2. JUSTIFICATIVA

As otites em animais de estimação são causas frequentes de visitas e consultas a clínicas veterinárias e figuram entre os principais problemas na área de Clínica de Pequenos Animais. Os inúmeros relatos de micro-organismos multirresistentes às drogas, assim como a capacidade desses micro-organismos de se organizarem na forma de biofilmes, justificam a necessidade da descoberta de compostos com atividade antimicrobiana. Assim, o estudo de novos fármacos para o combate a estas infecções, bem como a pesquisa sobre possíveis drogas que venham a contribuir como alternativas terapêuticas nas infecções causadas por *M. pachydermatis*, *S. aureus*, *S. pseudintermedius* e *P. aeruginosa* vêm de encontro ao interesse de profissionais da área.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Estudar a atividade antimicrobiana de extratos de *C. baccatum* var. *pendulum* e de *H. sabdariffa* L. e de substâncias sintéticas como HPAs sobre a levedura *M. pachydermatis* e as bactérias *S. aureus*, *S. pseudintermedius* e *P. aeruginosa*, como alternativa ao tratamento de animais portadores de otite.

3.2. Objetivos Específicos

- 1) Avaliar o perfil dos micro-organismos utilizados nos ensaios de inibição, pelo teste de resistência aos antimicrobianos e por PCR;
- 2) Testar o efeito *in vitro* dos extratos brutos de *C. baccatum* var. *pendulum* sobre a levedura *M. pachydermatis* e sobre as bactérias *S. aureus*, *S. pseudintermedius* e *P. aeruginosa*;
- 3) Testar o efeito *in vitro* do extrato bruto de *H. sabdariffa* L. sobre a levedura *M. pachydermatis* e sobre as bactérias *S. aureus*, *S. pseudintermedius* e *P. aeruginosa*;
- 4) Testar o efeito *in vitro* dos sais de HPAs sobre a levedura *M. pachydermatis* e sobre as bactérias *S. aureus*, *S. pseudintermedius* e *P. aeruginosa*;
- 5) Analisar o efeito dos extratos brutos de *C. baccatum* var. *pendulum* e de *H. sabdariffa* L. e dos HPAs sobre a permeabilização de membranas das células fúngicas e bacterianas por microscopia óptica de fluorescência;
- 6) Analisar o efeito dos extratos brutos de *C. baccatum* var. *pendulum* e de *H. sabdariffa* L. e dos HPAs sobre a estrutura dos biofilmes de *M. pachydermatis*, *S. aureus*, *S. pseudintermedius* e *P. aeruginosa*, por microscopia eletrônica de varredura;
- 7) Analisar o efeito dos extratos brutos de *C. baccatum* var. *pendulum*. e de *H. sabdariffa* L. e dos HPAs sobre a morfologia e estrutura das células fúngicas e bacterianas por microscopia eletrônica de transmissão.

4. REVISÃO DE LITERATURA

4.1. Otite Canina

As otites caninas são resultado de qualquer inflamação do conduto auditivo, tendo o envolvimento de diversos agentes etiológicos e fatores predisponentes que se relacionam com essa infecção (GREENE, 1993). Assim, são classificadas como otite desde inflamações na porção externa do pavilhão auricular até as complicações envolvendo o sistema vestibulococlear, não importando sua extensão ou gravidade (LEITE, 2000).

As otites caninas são classificadas quanto à sua lateralidade, podendo ser uni ou bilateral, quanto à evolução aguda, crônica ou crônica recidivante, e localização da inflamação, podendo ser no ouvido externo, médio ou interno (Figura 1).

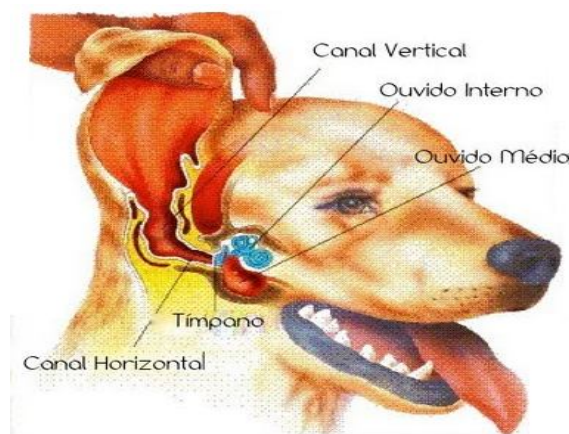


Figura 1: Divisão anatômica do ouvido do cão. Fonte: Google imagens

A otite externa crônica tem sido a mais estudada, pois representa um problema de maior ocorrência na clínica médica de pequenos animais, correspondendo a cerca de 76,7% dos casos (FARIAS, 2002) e definida como uma infecção contínua ou recorrente do conduto auditivo externo por um período de tempo igual ou superior a seis meses (COLE et al., 1998).

Na otite média a membrana timpânica é acometida, podendo se apresentar espessada ou rompida parcial ou totalmente, assim possibilitando a infecção da cavidade timpânica, localizada mais internamente. Porém, também

pode ocorrer a otite média mesmo com a membrana timpânica intacta, já que esta é capaz de se recompor após sua ruptura inicial (COLE et al., 1998).

Na otite interna os canais semicirculares são acometidos, causando transtornos de equilíbrio. Caso atinja a cóclea, desencadeará uma patologia denominada labirintite. Acredita-se que a maioria dos casos de otite interna seja uma extensão da otite média, que por sua vez seria uma extensão da otite externa (HARVEY et al., 2004).

A epiderme do canal auditivo externo é semelhante à da pele, ou seja, um epitélio cornificado estratificado, com órgãos anexos como os folículos pilosos, as glândulas apócrinas (ceruminosas) e as glândulas sebáceas (HARVEY et al., 2004).

A temperatura normal dentro do meato acústico externo de cães é de 38,2º a 38,4ºC, não havendo diferença entre as diferentes raças caninas nem entre ter ou não ter o pavilhão acústico pendular. Nos casos de otite externa a temperatura passa a ser de 38,9ºC (HARVEY et al., 2004; GRONO, 1970). Outro fator predisponente da otite externa é a umidade relativa dentro do meato acústico externo, que é em média 80,4% (HARVEY et al., 2004).

Com relação à sua apresentação clínica, a otite externa pode ser classificada como aguda, subaguda ou crônica. As duas primeiras são assim consideradas quando a doença tem menos de 30 dias de duração. Segundo Little e colaboradores (1991), a otite externa crônica pode ser definida como aquela que persiste por mais de seis semanas, sendo normalmente bilateral. Já Cole e colaboradores (1998) definem como otite crônica todas as infecções recorrentes ou contínuas com duração mínima de seis meses. E segundo esses autores, cães com otite externa crônica frequentemente apresentam otite média, mesmo que suas membranas timpânicas mostrem-se intactas.

As alterações clínicas mais vistas na otite externa são: eritema, edema, crostas, descamação, alopecia e pelos partidos na face interna do pavilhão auditivo; alterações no posicionamento da cabeça e dor a palpação também são observadas (HARVEY et al., 2004).

Segundo August (1993), a ocorrência da otite externa inclui fatores primários, predisponentes e perpetuantes. Os fatores primários compreendem: presença de parasitas, hipersensibilidade alterada, presença de corpos estranhos, imunopatias e desordens de ceratinização. Além destes, Little e

Lane (1989) relatam também pequenos tumores e pólipos auriculares como fatores primários das otites caninas. Já como fatores predisponentes têm-se: conformação das orelhas, morfologia do conduto auditivo, maceração do epitélio, doenças sistêmicas e alterações climáticas. Os fatores perpetuantes incluem: infecção bacteriana e/ou fúngica no conduto auditivo externo, alterações progressivas nesse conduto auditivo e presença de otite média (BONATES, 2003).

4.2. Principais Micro-organismos Envolvidos nas Otites Caninas

O isolamento de micro-organismos de orelhas caninas infectadas nem sempre indica que os mesmos sejam os agentes causais da otite, pois existe uma grande variedade de micro-organismos comensais e potencialmente patogênicos no canal auditivo normal dos cães. Além disso, frequentemente a otite canina tem mais de um agente microbiano envolvido (MANSFIELD et al., 1990).

A microbiota normal do conduto auditivo externo canino é constituída basicamente por *Staphylococcus* sp., *Bacillus* sp. e *Malassezia pachydermatis* e altera-se de forma significativa em cães otopatas, surgindo bastonetes Gram-negativos como *Pseudomonas* sp., *Proteus* sp. e *Escherichia* sp. (MAGALHÃES et al., 1985; SHELL, 1993; LEITE, 2000).

4.2.1. *Malassezia pachydermatis*

Morfologicamente esta levedura se apresenta como células isoladas ou em grupos, medindo 1-3 μ m x 2-4 μ m, com formato oval ou germinação unipolar de base larga, adquirindo a forma “de garrafa” (MULLER et al., 1989; LACAZ et al., 2002) (Figura 2).



Figura 2: Levedura *Malassezia pachydermatis*. Fonte: www.agefotostock.com

A característica mais marcante de *M. pachydermatis* é sua natureza lipofílica, usando para seu crescimento os lipídios encontrados no cerúmen canino (MASUDA et al., 2000). Mason e Evans (1991) afirmaram que mudanças no micro-clima do canal auditivo decorrentes da infecção, como a quantidade excessiva de cerúmen produzido, são responsáveis pela mudança de *M. pachydermatis* de comensal para patogênica. Masuda et al. (2001) observaram que as células leveduriformes de *M. pachydermatis* não estão aderidas diretamente às células epiteliais cornificadas, havendo uma camada lipídica entre elas e o epitélio. Alterações na composição dos lipídios no cerúmen podem participar na promoção ou inibição do crescimento dessa levedura *in vivo* (HUANG; LITTLE, 1993).

O isolamento da levedura é realizado em meio de cultivo com ágar Sabouraud e a temperatura de incubação varia entre 25° e 41°C por 24 a 48 horas ou até 96 horas, sendo a temperatura ótima de crescimento 37°C em cerca de 48 horas (AKERSTEDT; VOLLSET, 1996). As colônias são opacas de coloração amarelo creme, passando à marrom alaranjado conforme o envelhecimento, a superfície é redonda ou em forma de cúpula, a medida transversal é de 1-3mm e a textura é seca, friável e granulosa e algumas vezes gordurosa (GUILLOT et al., 1996).

M. pachydermatis é considerada um habitante normal e patógeno oportunista do meato acústico externo de cães e gatos, podendo também ser encontrada no reto, nos sacos anais, na vagina, na pele interdigital, no tegumento cutâneo, na gengiva e na placa dentária (BOND et al., 1994; BOND; ANTONY, 1995; CARLOTTI, 1997; BOND et al., 2000; NASCENTE et al., 2004; SANTIN et al., 2008), sendo considerada, por diversos autores, um dos mais frequentes micro-organismos associados com a otite externa canina,

especialmente em animais com queda imunológica (BORNAND et al., 1992; NOBRE et al., 2001; SARIDOMICHELAKIS et al., 2007). Também se deve destacar o potencial zoonótico desta levedura. Em 1998, CHANG et al., relataram um surto de malasseziose em bebês em cuidados intensivos. Neste caso, *M. pachydermatis* foi introduzida no ambiente hospitalar por um profissional de saúde proprietário de um cão com otite.

4.2.2. *Staphylococcus* sp.

O gênero *Staphylococcus* pertence à família *Micrococcaceae* e é composto por 37 espécies, das quais 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas. Apresentam-se em formas esféricas (cocos) Gram-positivas, medindo cerca de 0,5 - 1,5 μ m de diâmetro, as quais podem apresentar-se isoladas, aos pares, em cadeias curtas ou grupos em forma de cachos irregulares (KLOSS; BANNERMAN, 1995) (Figura 3). Os membros dessa espécie são não esporulados, imóveis e anaeróbios facultativos, porém, têm melhor desenvolvimento em atmosfera aeróbia. Suas colônias em meio sólido são normalmente lisas, porém, algumas vezes podem se apresentar convexas com a borda contínua. Algumas colônias podem ter pigmentação amarela, ou amarelo-alaranjado, que se torna mais evidenciada após incubação à temperatura ambiente, enquanto outras colônias podem ser esbranquiçadas ou acinzentadas (BANNERMAN et al, 1995). Além disso, algumas cepas de *S.aureus* podem produzir uma zona difusa de β -hemólise ao redor da colônia, evidenciada após incubação prolongada (KLOSS, 1997).

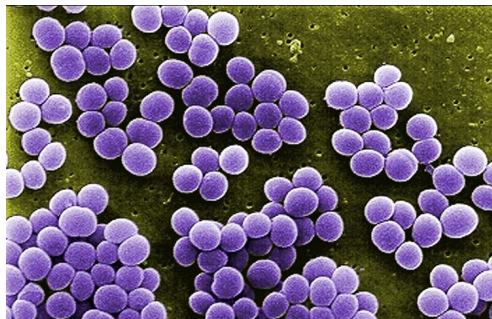


Figura 3: *Staphylococcus* sp. Fonte: www.bacteriainphotos.com

Para a diferenciação de espécies e subespécies do gênero *Staphylococcus* sp., as principais características utilizadas são: diâmetro da colônia em mm (> 5mm), pigmento carotenóide da colônia, crescimento aeróbico, crescimento anaeróbico em tioglicolato, crescimento em ágar contendo 10 e 15% de cloreto de sódio (NaCl), crescimento a 15 e 45°C, teste de oxidase (detecção do citocromo C), produção de ácido láctico a partir de L(+) - isômeros e D(-) - isômeros, produção de acetoina, teste da aldolase, produção de ácidos a partir de diversos substratos, presença de enzima hialuronidase, redução de nitrato, teste da fosfatase alcalina, coagulase (sangue de coelho), hemólise, produção de DNase, resistência à novobiocina (concentração inibitória mínima $\geq 1,6 \mu\text{g/mL}$) e testes de catalase, dentre outros (BIBERSTEIN; HIRSH, 2003).

As várias espécies do gênero *Staphylococcus* sp. são frequentemente encontradas tanto em cães saudáveis como em doentes, podendo causar uma grande variedade de infecções, incluindo bacteremia, pneumonia, furúnculos, abscessos, piodermites, conjuntivite e otite externa (LILENBAUM et al., 2000).

Até início dos anos 80, *S. aureus* era o principal patógeno cutâneo isolado a partir de lesões piogênicas de cães. Porém, após a realização de estudos taxonômicos, uma nova espécie de estafilococos foi isolada: *S. intermedius*, sendo que posteriormente vários estudos indicaram essa espécie como a mais prevalente em otites e piodermites em cães (CONCEIÇÃO; FABRIS, 1999). É, por esse motivo, que alguns autores, como Blue e Wolley (1977) citam a espécie *S. aureus* como a mais frequentemente isolada em cães com otite externa, visto que na época de seus estudos não havia ocorrido a mudança na taxonomia bacteriana.

O nível de diversidade fenotípica e genotípica observado entre isolados de *S. intermedius* levou alguns autores a colocar a hipótese da existência de um grupo de *S. intermedius* (SIG), constituído por mais do que uma espécie ou subespécies (BANNOEHR et al., 2007). Dessa forma, um estudo japonês reclassificou através de um método genotípico, estirpes previamente identificadas como *S. intermedius*, em *S. intermedius*, *S. pseudintermedius* e *S. delphini*; sendo que a maioria dos isolados de cães, gatos e humanos nesse estudo foram reclassificados como *S. pseudintermedius* (SASAKI et al., 2007).

Assim, o patógeno canino pode ser reclassificado como *S. pseudintermedius* (BANNOEHR et al., 2007; SASAKI et al., 2007; GUARDABASSI et al., 2010).

No cão, *S. pseudintermedius* tem sido a principal espécie de coco Gram-positivo descrita em otites (COLE et al., 1998; LILENBAUM et al., 2000; NOBRE et al., 2001). Ao estudar a prevalência de *S. pseudintermedius* a partir de amostras de orelhas caninas infeccionadas, em um período de cinco anos, Petersen e colaboradores (2002) verificaram que 49,4% das amostras resultaram em cultivo desta bactéria. Yamashita e colaboradores (2005), no Japão, isolaram estafilococos em 48,3% das amostras da secreção auricular de cães com otite externa, e em 68,3% das amostras de cães sem otite, reiterando a constatação de que este gênero é o mais prevalente em orelhas caninas, com e sem otite externa. Mais recentemente, Cavalcante e colaboradores (2010) encontraram uma prevalência de 50% dessa bactéria em ouvidos de 32 cães otopatas.

Existe um potencial zoonótico apresentado por cepas de *S. pseudintermedius*, mais comumente relacionado a injúrias invasivas, como mordidas por cães ou cateteres contaminados. Entretanto, é possível a infecção não invasiva desta bactéria de um cão contaminado para o ser humano, sendo que Tanner e colaboradores (2000) fizeram um dos primeiros relatos dessa possibilidade. No caso relatado por esses autores, o paciente humano apresentava otite externa infecciosa, sendo detectado (por PCR) que o agente causador era *S. pseudintermedius*, o mesmo patógeno presente na otite externa do seu cão.

A segunda espécie de estafilococos mais frequentemente encontrada em otites caninas é *S. aureus*. Em um estudo da prevalência dessas bactérias, das 18 amostras coletadas de cães otopatas, 44,4% foi *S. pseudintermedius* e 38,9% foi *S. aureus* (TUNON, et al. 2008). Hwang et al. (2002) realizaram estudo bacteriológico em 161 pacientes e observaram que *S. aureus* foi tão frequente quanto *P. aeruginosa* em pacientes com otite externa, sendo o mesmo resultado encontrado por Nogueira e colaboradores (2008).

S. aureus resistente à metilicina (MRSA) representa grande impacto no tocante ao controle de infecções nas instituições de saúde. Porém, MRSA já não é mais um problema de saúde associado somente a humanos, mas é agora um problema associando a toda comunidade, incluindo os animais de

companhia (CEFAI et al., 1994; STRUELENS et al., 2009; WEESE et al., 2010).

4.2.3. *Pseudomonas aeruginosa*

As espécies do gênero *Pseudomonas* sp. são bacilos Gram-negativos, não formadores de esporos, pertencentes à família *Pseudomonadaceae*, usualmente, móveis, retos ou ligeiramente curvos tipicamente dispostos aos pares (medindo 1 a 5µm de comprimento e 0,5 a 1µm da largura) (Figura 4). Os micro-organismos utilizam carboidratos através da respiração aeróbica, tendo o oxigênio como aceptor final de elétrons. Embora descritos como aeróbios obrigatórios, podem crescer de modo anaeróbio usando o nitrato ou arginina como um aceptor alternativo de elétrons. Sendo assim, podem crescer em número variado de meios, desde os mais simples até os mais complexos. Colônias de *P. aeruginosa* podem ter uma morfologia variada, mas costumam aparecer espalhadas sobre a placa (MURRAY et al., 2010).



Figura 4: *Pseudomonas aeruginosa*. Fonte: www.pseudomonas.com

P. aeruginosa produz os pigmentos pioverdina (pigmento fluorescente) e piocianina (pigmento de cor azul) responsáveis pela cor verde brilhante característica das suas colônias. Algumas amostras produzem também outros pigmentos hidrossolúveis como piorrubina (avermelhado) ou piomelanina (marron a preto) (VASIL, 1986).

Esta bactéria pode ser isolada a partir de tecidos de animais saudáveis e foi determinada como sendo a causa distinta de um grande número de

diferentes infecções, tais como otite externa, dermatite, conjuntivite, infecções do trato urinário, septicemia e endocardite bacteriana (MEKIC et al., 2011).

No trabalho de Yoshida e colaboradores (2002) foram realizadas culturas microbiológicas do exsudato otológico de 187 cães, sendo 77 sadios e 110 com otite externa. *Staphylococcus* sp. e *M. pachydermatis* foram os micro-organismos mais frequentemente isolados, tanto dos cães com ou sem otite externa, enquanto *P. aeruginosa* foi isolada apenas de cães com otite externa. Dickson; Love em 1983 também já haviam feito essa observação, destacando a presença de *Pseudomonas* sp. principalmente nas otites crônicas. Adicionalmente, Tater e colaboradores (2003) verificaram que na citologia da secreção da orelha externa de cães sadios nunca foi observada a presença de bacilos. O fato de *P. aeruginosa* somente ser encontrado em orelhas com infecção indica que a detecção dessa bactéria em qualquer orelha é indicativa de otite (YOSHIDA et al., 2002).

4.3. Micro-organismos multirresistentes aos fármacos

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

O conhecimento do fenômeno da resistência a agentes físicos e químicos entre os micro-organismos data do início da era microbiana, com a introdução das primeiras substâncias químicas com finalidade quimioterápica específica. O início do uso clínico dos antimicrobianos, nas décadas de 40 e 50, trouxe para todo o mundo a equivocada ilusão de que os antibióticos

seriam substâncias capazes de controlar todas as doenças infecciosas até então responsáveis por milhares de mortes (MOREILLON, 1995; TAVARES, 2000).

O advento do uso clínico das sulfonamidas, em 1933, e em seguida o da penicilina, em 1941, levou à constatação científica de que a resistência bacteriana aos agentes antimicrobianos podia ser uma característica natural das espécies, ou ser adquirida por cepas individuais dentro de uma população sensível. A crescente evolução da resistência antimicrobiana provém de um cenário multifatorial que inclui a utilização excessiva e/ou inadequada dos antibióticos no ambiente hospitalar, na comunidade, nas indústrias alimentícias e veterinárias, bem como a relativa facilidade com que os microrganismos resistentes ultrapassam barreiras geográficas. A importância dos agentes antimicrobianos no aumento do fenômeno da resistência reside no seu papel selecionador das estirpes resistentes, através da pressão seletiva resultante de seu amplo emprego (TAVARES, 2000; HOSEIN et al., 2002; SEFTON, 2002).

Introduzida na década de 60, a meticilina foi a primeira penicilina semissintética produzida resistente à inativação pelas enzimas β -lactamases. Posteriormente, outros compostos resistentes à ação das penicilinas foram desenvolvidos, como a oxacilina e nafcilina. Logo após sua introdução na terapêutica clínica, foi relatado o primeiro caso de *S.aureus* resistente à meticilina (MRSA), em 1961, proveniente de um hospital britânico (JEVONS, 1961).

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno genético, relacionado à existência de genes no micro-organismo que codificam diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação dos fármacos. Uma das origens da resistência é a importação dos genes causadores do fenômeno, consistindo na resistência transferível ou horizontal (TAVARES, 2000; ALTERTHUM, 2005). A transferência horizontal do gene *mecA* em *Staphylococcus* sp. tem contribuído para a circulação mundial de clones meticilina-resistentes e multidroga-resistentes e tem sido apontada como mecanismo comum de resistência a fármacos (TRAMPER-STRANDERS et al., 2007).

O fato de *S. pseudintermedius* ser o agente bacteriano mais comumente implicado nas otites caninas faz com que esta seja a espécie que é mais frequentemente controlada por antibioticoterapia nestas situações (SCOTT et

al, 2001; HAUSCHILD; WÓJCIK, 2007; PENNA et al., 2013). Com relação às estirpes de *S. pseudintermedius* meticilina-resistentes (MRSP) a sua frequência de isolamento é considerada baixa, mas já é descrita em isolados cutâneos há algum tempo (KANIA et al., 2004; MORRIS et al., 2006; JONES et al., 2007; PAUL et al., 2011).

Em um estudo realizado por Paul e colaboradores (2011), 128 médicos veterinários tiveram amostras nasais coletadas e investigadas com relação à presença de MRSP e MRSA. Desses 128 profissionais, 5 (3,9%) foram positivos para MRSP e 2 (1,6%) foram positivos para MRSA. *S. aureus* sensível à meticilina (MSSA) foi isolado em 32 (25%) desses 128 profissionais, enquanto que *S. pseudintermedius* sensível à meticilina (MSSP) não foi detectado, o que sugere haver uma habilidade especial de MRSP em colonizar os seres humanos em comparação com MSSP. Uma outra conclusão desse estudo é que MRSP não está presente somente entre os animais de estimação, como documentado por estudos anteriores, mas também entre médicos veterinários.

Uma vez que o *S. pseudintermedius* é um comensal canino e é normalmente raro no homem, têm-se sugerido que a transmissão é feita a partir do cão. Porém, *S. pseudintermedius* raramente causa doença no homem, mas existe um risco potencial de transmissão de genes de resistência entre *S. pseudintermedius* e os estafilococos patogênicos no homem. Por exemplo, os genes que conferem resistência à tetraciclina e aos plasmídeos estruturalmente relacionados com origem em *S. aureus* humanos, têm sido também identificados em estirpes de *S. pseudintermedius* caninas, o que sugere que é possível a troca genética entre estas duas espécies de bactérias (DUQUETTE; NUTTALL, 2004; GUARDABASSI et al., 2004).

S. aureus é, talvez, o patógeno de maior preocupação devido à virulência intrínseca, à diversidade de infecções potencialmente fatais e à sua capacidade de adaptação às diferentes condições ambientais. Cerca de mais de 90% dos isolados de estafilococos nosocomiais e comunitários são produtores de penicilinase e resistentes a outras classes antibióticas como macrolídeos (eritromicina), estreptomicinas e tetraciclinas (LOWY, 2003).

Atualmente as infecções por *S. aureus* meticilina-resistentes nos animais de companhia têm sido de grande relevância, dada a sua importância em

medicina humana. Geralmente, as cepas de MRSA em animais de companhia diferem daquelas em animais de produção. Isso, provavelmente, porque em animais de companhia a aquisição de MRSA é principalmente uma "humanose", ou seja, as cepas são transportadas por proprietários humanos que são passadas para os seus animais (MORGAN, 2008).

Uma transmissão de MRSA intra-hospitalar foi relatada na ala para idosos de uma casa de repouso britânica, onde três pacientes estavam colonizados. Rastreamento foi feito nos profissionais de saúde e no gato residente (que muitas vezes dormia no travesseiro dos pacientes), revelando cinco enfermeiras, o fisioterapeuta e o gato portadores. Presumiu-se que o gato tenha adquirido MRSA a partir da pele ulcerada de um paciente fortemente colonizado. Já aos profissionais de saúde, foi assumido como sendo devido à sua falta de higiene e falta de lavagem das mãos após acariciar o gato (SCOTT et al., 2001). Transmissão de *S. aureus* entre humanos e cães foi também relatada em uma família onde uma senhora diabética, seu marido, filho e cão foram todos colonizados (DUIJKEREN et al., 2005).

Diante de inúmeros relatos, parece ser provável que haja colonização/infecção dos animais através do contato com humanos colonizados ou infectados e que os animais possam tornar-se fontes de reinfecção ou recolonização para o homem (LOEFFLER et al., 2005; ISHIHARA et al., 2010; MCCARTHY et al., 2012).

Outro micro-organismo de grande importância, *P. aeruginosa*, é intrinsecamente resistente a muitas drogas e é virtualmente capaz de se tornar resistente a qualquer antimicrobiano (HANCOCK, 1998). Testes de susceptibilidade antimicrobiana devem ser um passo crucial para a seleção da terapia apropriada, mas *P. aeruginosa* pode desenvolver resistência durante o tratamento prolongado com todos os antibióticos, especialmente nos casos crônicos (SEOL et al., 2002). Portanto, os isolados que são inicialmente suscetíveis podem tornar-se resistentes no prazo de três a quatro dias após o início da terapia (NCCLS, 2004).

A grande maioria das amostras de *P. aeruginosa* é resistente às aminopenicilinas, à associação de amoxicilina e ácido clavulânico, à associação de ampicilina e sulbactam, às cefalosporinas de primeira, de segunda e, algumas vezes, de terceira geração, às tetraciclinas, aos

macrolídeos, à rifampicina e à associação de trimetoprima e sulfametoxazol (COLE et al., 1998; BARRASA et al., 2000; WERCKENTHIN et al., 2007; MEKIC et al., 2011; XIAO et al., 2012).

Os antibacterianos ciprofloxacina, enrofloxacina e gentamicina, de grande utilização em medicina veterinária e considerados eficazes contra *P. aeruginosa* (KISS et al., 1997; COLE et al., 1998), apresentaram uma alta porcentagem de isolados com sensibilidade intermediária (MEKIC et al., 2011). Werckenthin e colaboradores (2007) testaram 71 isolados de *P. aeruginosa* do ouvido, pele e boca de cães e gatos e também encontraram uma alta proporção (44%) de isolados com sensibilidade intermediária a esses antibacterianos. No trabalho de Moreno e colaboradores (1995) não foi encontrada qualquer estirpe de *P. aeruginosa* de otite externa canina suscetíveis a enrofloxacina, sendo que 44,4% delas foram resistentes e 55,6% intermediárias.

Os mecanismos de resistência em *M. pachydermatis* até agora não foram caracterizados e a classificação dos isolados como susceptíveis ou resistentes tem como base a susceptibilidade em testes *in vitro*. Historicamente, os testes de susceptibilidade antifúngica foram realizados por uma variedade de métodos (CUENCA-ESTRELLA; RODRIGUEZ-TUDELA, 2010). Uma das abordagens mais populares se baseia na medição da inibição do crescimento do patógeno uma vez que está exposto, durante um período de tempo definido, a uma gama de concentrações de fármacos diluídos em meio líquido ou sólido (PEANO, 2011).

Na prática clínica, a otite recorrente causada por *M. pachydermatis* tem sido constantemente relatada, e falha no tratamento tem sido muitas vezes atribuída à resistência ao antifúngico utilizado. Isto pode ser confirmado por estudos que relatam isolados de *M. pachydermatis* resistentes a vários azóis (BERNARDO et al., 1998; NASCENTE et al., 2009; NIJIMA et al., 2011; CAFARCHIA et al., 2012). Porém, em outro estudo com a mesma finalidade, não foram encontradas cepas resistentes aos antifúngicos clotrimazol, miconazol e tiabendazol (PEANO, 2011).

4.4. Diagnóstico da Otite Canina

Para um diagnóstico eficiente, deve-se ter em mente que o objetivo final será identificar a causa primária da otite. Nesse sentido, várias são as etapas que constituem o diagnóstico clínico e laboratorial da otite canina.

Segundo Rosser (1993), a anamnese deve incluir aspectos relacionados com o estado geral de saúde, existência de problemas metabólicos e/ou endócrinos, exposição recente a outros animais, problemas dermatológicos em outras áreas do corpo, tratamento anterior do conduto auditivo, raça, doenças que sugiram de debilidade imunológica e relação com fatores epidemiológicos.

A realização de exame físico completo do animal é essencial para pesquisar evidências de doença sistêmica e investigar as causas primárias. O exame otoscópico do canal auditivo externo e da membrana timpânica é o primeiro procedimento que deve ser realizado no cão com otite (HARVEY et al., 2004). O objetivo do exame otoscópico é observar a condição da orelha, buscando por massas tumorais ou corpos estranhos; avaliando a presença, consistência e coloração de qualquer exsudato; e notando a presença e aspecto da membrana timpânica. Apenas após essa avaliação otológica pode ser estabelecido o tratamento, bem como determinada a necessidade de exames diagnósticos adicionais (ROSYCHUK, 1994).

O exame citológico do conduto auditivo é uma importante ferramenta diagnóstica da otite canina e fornece uma base para acompanhamento do tratamento até a cura ou controle (GOTTHELF, 2000). Segundo Leite (2003a,b), os elementos a serem observados incluem as células do epitélio do conduto auditivo externo e possíveis componentes exógenos (corpos estranhos, ácaros, células neoplásicas, eritrócitos, leucócitos e piócitos). A contagem de células leveduriformes por campo tem sido avaliada no esfregaço citológico e correlacionada com o aparecimento de sinais clínicos. August (1993) afirma que a presença de um número superior a 10 células leveduriformes/campo sugere a presença de otite externa. Segundo Angus (2004), a identificação de 25 bactérias por campo também é sugestiva de atividade microbiana, já sendo suficiente para o início de intervenção terapêutica.

Muitas vezes apenas um micro-organismo é isolado na cultura bacteriana, embora frequentemente obtenha-se mais de um organismo patogênico, caracterizando-se uma infecção mista. Nesses casos é importante combinar o exame citológico com a cultura, pois isso permite que o clínico determine qual bactéria está predominando (LOGAS, 1994).

A obtenção de amostras de secreção auricular oriundas de ouvido externo canino dá-se através da utilização de suabes flexíveis estéreis, preferencialmente a partir da porção horizontal do conduto auditivo, evitando-se a contaminação da amostra com sujidades presentes na porção mais externa do pavilhão auricular (MUELLER et al., 2011).

A partir do material coletado com suabe, a presença de micro-organismos é avaliada em esfregaços corados pelo método de Gram. Procedimentos de cultura de micro-organismos bacterianos e fúngicos devem ser realizados como descrito na literatura (SIDRIM; MOREIRA, 1999; KONEMANN et al., 2000). As normas para realização de antibiograma são descritas no manual do NCCLS (2004) para a área veterinária.

Quando o paciente apresentar otite crônica é aconselhada a realização de exames complementares para investigar se há comprometimento da orelha média e/ou calcificação das cartilagens auriculares (TULESKI, 2007). A radiografia do sistema vestibulococlear é um dos exames mais esclarecedores no diagnóstico das otopatias em caninos, especialmente em se tratando de otite média (LEITE, 2003a,b).

4.5. Tratamento das Otites em Cães

O tratamento da otite externa em cães inclui limpeza do canal auditivo externo com removedores de cerúmen e o uso de formulações comerciais tópicas, contendo anti-inflamatório, antibacteriano e antifúngico e, em alguns casos, terapia sistêmica (MUELLER et al., 2009). Contudo, a terapia da otite não pode desconsiderar o diagnóstico e tratamento da causa primária específica, pois somente dessa forma é possível minimizar sua deletéria estimulação contínua (ANGUS et al., 2004).

A seleção de medicamentos otológicos específicos para o tratamento de otite canina tem como base o agente etiológico e o estado da membrana

timpânica (GREENE, 1993). Não existe um único agente ou tratamento perfeito para a otite, as preparações destinadas para esta enfermidade, usualmente contêm vários princípios ativos. Segundo Griffin (1996), a terapia sistêmica deve ser reservada para casos graves e/ou crônicos de otite externa, ou seja, todos os casos devem ser tratados com terapia local e os mais graves também com medicação geral.

Em infecções mistas com fungos e bactérias deve-se realizar tratamento simultâneo com uma combinação medicamentosa que contenha agentes antifúngicos e antibacterianos. Se existir muita inflamação deve-se utilizar inicialmente um esteroide tópico junto com os antimicrobianos (GRIFFIN, 1996).

O uso de esteroide em busca da ação benéfica dos glicocorticoides se dá devido às propriedades anti-inflamatórias e antipruriginosas, levando a diminuição do edema e da exsudação. Além disto, levam a atrofia das glândulas sebáceas, promovendo a diminuição da secreção. Podem também diminuir a formação de tecido cicatricial e alterações proliferativas, ajudando assim na promoção da drenagem e da ventilação. A terapia sistêmica com glicocorticoides é recomendada em casos de otite externa com inflamação do meato acústico ou em que as alterações progressivas tenham causado acentuada estenose do canal (GRIFFIN, 1996). Inicialmente preconiza-se o uso tópico de um glicocorticoide potente, como a fluocinolona, a dexametasona ou a betametasona (GRIFFIN, 1996), substituído posteriormente por fármacos menos potentes, como a prednisona ou a hidrocortisona para manutenção (NUTTAL; COLE, 2004).

Os antibacterianos são indicados na sua forma tópica quando bactérias estão presentes, seja de forma primária ou secundária, porém em alguns casos é necessária a administração de medicação sistêmica. Os aminoglicosídeos (gentamicina, amicacina, tobramicina e neomicina), mais comumente encontrados nas combinações medicamentosas otológicas, são antibacterianos potentes e com boa atividade contra estafilococos e bactérias Gram-negativas encontradas nos casos de otite externa. Entretanto, os aminoglicosídeos podem ser ototóxicos quando utilizados por períodos prolongados ou em animais com o tímpano rompido (WHITE, 1999).

Em casos graves de otite, com isolamento de *P. aeruginosa*, deve-se usar imediatamente antibacterianos ou quimioterápicos injetáveis como polimixina B, sulfadiazina ou enrofloxacina. O uso oral de cefalexina, cloranfenicol, fluorquinolonas e outros são apropriados em casos de otite crônica, principalmente quando isolados os agentes etiológicos *S. pseudintermedius*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, porém a terapia tópica também é importante no esquema terapêutico (WHITE, 1999).

As otites causadas por *M. pachydermatis* são normalmente muito difíceis de controlar e recorrentes, requerendo tratamento antifúngico em longo prazo (NAKANO et al., 2005). Há grande variação na literatura quanto ao melhor antifúngico para tratamento da malassezioze ótica. Rougier et al. (2005), verificaram que a sensibilidade *in vitro* da levedura *M. pachydermatis* isolada de otites caninas é maior para a nistatina (84%), seguida pelo miconazol (77,4%) e clotrimazol (75,5%). Nakano et al. (2005), verificaram que as sensibilidades *in vitro* de *M. pachydermatis* ao cetoconazol, à terbinafina e à nistatina foram semelhantes. Eichenberg et al. (2003), obtiveram 100% de sensibilidade *in vitro* ao itraconazol, 97,6% ao fluconazol, e 96,3% ao cetoconazol.

Porém, casos de insucessos terapêuticos são relatados com certa frequência e ocorrem principalmente quando não são realizados exames auxiliares como cultura e antibiograma, sendo os animais tratados com antibacterianos inespecíficos e que não têm ação antifúngica (CORREA; CORREA, 1992). Assim, há a crescente necessidade de mais estudos com novos fármacos para o combate às otites caninas, bem como a pesquisa sobre possíveis substâncias que venham a contribuir como alternativas terapêuticas nas infecções causadas por esses micro-organismos.

4.6. Biofilmes em Otites

Biofilmes são definidos como comunidades bacterianas/fúngicas estruturadas envoltas de matriz extracelular polimérica própria, aderida a superfícies bióticas ou abióticas (COSTERTON et al., 1999). É um fator de virulência que confere vantagem evolutiva aos micro-organismos que o possuem, uma vez que favorece a sua cooperação metabólica e permuta

genética, além de lhes conferir proteção contra o sistema imunitário do hospedeiro e contra agentes antimicrobianos (DAVEY; O'TOLLE, 2000).

A formação de um biofilme começa sempre pela adesão do micro-organismo a uma superfície. Em um segundo momento, a adesão microbiana é consolidada pela ação de adesinas e pela produção de uma matriz polissacarídica que irá formar complexos com a superfície. Quando as bactérias se encontram ligadas à superfície de forma estável, começa o processo de maturação do biofilme. A densidade e a complexidade do biofilme aumentam à medida que os micro-organismos ligados à superfície se multiplicam e os constituintes extracelulares por eles gerados interajam com moléculas orgânicas e inorgânicas do meio ambiente, formando o glicocálice. Quando o biofilme atinge uma massa crítica e o equilíbrio dinâmico é atingido, nas zonas mais longínquas da superfície começam a libertar-se organismos dispersos, capazes de colonizar outras superfícies (DUNNE, 2002). O estudo aprofundado dos mecanismos presentes na formação do biofilme pode ser uma opção para o desenvolvimento de terapias que controlem as doenças crônicas (STEPHENS, 2002).

Em humanos, são doenças sabidamente causadas por biofilme a otite média, endocardite, infecção urinária, prostatite, osteomielite e todas as infecções relacionadas a materiais médicos. Na odontologia, a placa bacteriana tem sido considerada um biofilme (OVERMAN, 2000).

Em medicina veterinária, a formação de biofilmes tem elevada importância na etiologia das mastites (MELCHIOR et al., 2006). Baselga et al. (1993) sugerem que biofilme produzido por cepas de *S. aureus* mostram habilidade superior em aderir a superfície da mucosa da glândula mamária do que cepas não-produtoras de biofilme. Também de grande importância é a formação de biofilmes na indústria alimentícia, uma vez que o biofilme microbiano tem o potencial de atuar como fonte crônica de contaminação por patógenos que podem comprometer a qualidade do alimento e representar graves riscos à saúde do consumidor. Além disso, podem ocasionar prejuízos financeiros à indústria, em virtude da diminuição da vida-de-prateleira dos produtos alimentícios (CAIXETA, 2012).

Hoje em dia é grande a utilização de cateteres endovenosos centrais e de cateteres arteriais em medicina veterinária, onde a formação de biofilme

também representa um grande problema (SMARICK, 2008). As bactérias que colonizam os cateteres podem ter origens diferentes, porém a maioria é proveniente da microbiota da pele. Em um trabalho recente, 23 cepas de *S. pseudintermedius* resistentes a meticilina oriundas de cães, foram capazes de formar biofilme *in vitro* (OSLAND et al., 2012).

Infecções por biofilme podem durar meses, anos ou mesmo uma vida inteira. Embora comprometam a qualidade de vida, essas infecções são raramente fatais e são muitas vezes atribuídas a diferentes espécies de bactérias, tais como *P. aeruginosa* ou *S. aureus* (MILAGRES et al., 2008). A infecção pela bactéria *P. aeruginosa* é a principal causa de morte entre pacientes humanos com fibrose cística. Uma das causas da progressiva dificuldade de erradicação desse micro-organismo decorre de mudança fenotípica importante da bactéria, observada durante a infecção crônica. Destaca-se a aquisição do fenótipo mucóide, devido à produção de um exopolissacarídeo denominado alginato. Essa substância promove a formação de um biofilme no pulmão dos pacientes fibrocísticos, onde fica reduzida a ação de antibacterianos, anticorpos, fagócitos e do sistema do complemento (SAIMAN; SIEGEL, 2003).

Moreira e colaboradores (2012) pesquisaram a existência de cepas de *Staphylococcus* sp, oriundas de otite em cães, produtoras de biofilme pelo método de ágar Vermelho Congo. Dos 54 isolados, 16 (30%) se confirmaram com produtoras de biofilme, apresentando o crescimento de colônias negras. No trabalho de Cannizzo e colaboradores (2007), todas as amostras de *M. pachydermatis* provenientes do meato acústico de cães foram capazes de produzir biofilme, demonstrando a habilidade desta levedura em se aderir e formar biofilme sobre as superfícies de diferentes materiais, como poliestireno e poliuretano. Mais recentemente, Figueredo e colaboradores (2012) também testaram a habilidade de *M. pachydermatis* em produzir biofilme. Foram coletadas amostras de pele de cães com e sem lesões, totalizando 62 amostras, sendo que desse total, 95,2% foi capaz de formar biofilme.

A estreita relação entre otite externa crônica e otite média remete a pensar na probabilidade de biofilmes estarem também envolvidos nas otites caninas, principalmente naquelas recorrentes e de resolução apenas cirúrgica (FERGIE et al., 2004).

4.7. Substâncias Naturais e Sintéticas

4.7.1. *Capsicum baccatum* var. *pendulum*

O gênero *Capsicum* sp. pertence à ordem *Solanales* e à família *Solanaceae* (MOREIRA et al., 2006) e é popularmente conhecido por constituir as pimentas e os pimentões. Plantas deste gênero são arbustos típicos possuindo de 20-25 espécies, normalmente classificadas de acordo com o nível de domesticação. O Brasil destaca-se por possuir uma ampla diversidade em todas as categorias de pimentas e pimentões e são utilizados em todo o mundo como fonte de alimentos e na ornamentação de ambientes, porém mais recentemente o seu uso tem se intensificado na produção de fármacos, indústria alimentícia (como corantes e conservantes naturais), indústria química e bélica (SANTOS, 2010).

O Brasil possui uma ampla variedade de espécies de *Capsicum*, incluindo quatro espécies domesticadas (*C. annuum* var. *annuum*, *C. baccatum* var. *pendulum*, *C. chinense*, *C. frutescens*) (REIFSCHNEIDER e RIBEIRO, 2004). *C. baccatum* é uma espécie amplamente distribuída na América do Sul e popularmente conhecida como "aji", possuindo duas variedades, *C. baccatum* var. *pendulum* e *C. baccatum* var. *baccatum*. *C. baccatum* var. *pendulum* é popularmente conhecida como pimenta "cambuci" e apresenta como característica a fraca pungência, sendo considerada uma pimenta adocicada (BOSLAND et al., 1996) (Figura 5).



Figura 5: *Capsicum baccatum* var. *pendulum*. Fonte: www.impgc.com

A capsaicina (8-metil-N-vanilil 1-6-nonamida) é o componente ativo da pimenta vermelha e da pimenta chilli, e sua presença pode ser facilmente detectada devido à sua pungência, ou seja, ser irritante para a mucosa de mamíferos. Esta molécula pertence a uma classe de substâncias conhecidas como capsaicinoides, metabólitos secundários, provavelmente envolvidos em mecanismos de defesa de plantas contra herbívoros e fungos (SANTOS, 2010).

Informações a respeito da atividade biológica de *C. baccatum* frente a bactérias e fungos patogênicos ainda são escassas. Carvalho e colaboradores (2005) não encontraram atividade antibacteriana para a pimenta "cambuci", somente para outras pimentas com maior pungência. Em 2010, Santos demonstrou que os extratos brutos obtidos do fruto de *Capsicum annum*, outra espécie de pimenta também com baixa pungência, não apresentaram atividade sobre *Candida albicans* e as bactérias gram-negativas *Enterococcus faecalis* e *Escherichia coli*, enquanto que as cepas de *P. aeruginosa* apresentaram sensibilidade à capsaicina e ao seu análogo sintético SA4 (N-(4'-hidroxi-3'-metoxibenzil)-decanamida). Outro resultado relevante deste estudo foi uma satisfatória atividade antibacteriana de análogos sintéticos da capsaicina, SA2 e SA4, sobre a bactéria *Streptococcus mutans*, a principal bactéria causadora da cárie dental. O mesmo perfil antimicrobiano foi observado por Carvalho (2010) ao avaliar a atividade antibacteriana de pimentas e pimentões sobre bactérias causadoras de intoxicação alimentar.

4.7.2. *Hibiscus sabdariffa* L.

A família *Malvaceae* é constituída por mais de 100 gêneros de plantas, totalizando 2500 espécies nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas de ambos os hemisférios, mas particularmente abundantes nos trópicos americanos. Dentre os principais gêneros destaca-se *Hibiscus* sp., com cerca de 300 espécies (LEAL et al., 2007).

Este vegetal é proveniente da África Oriental, sendo um subarbusto anual ou subanual de caule arroxeadado, que atinge até 2m de altura e é uma planta de fácil cultivo (AMARO, 2010). Possui folhas alternas, flores solitárias e os frutos são cápsulas revestidas por pelos hispídeos (LORENZI; MATOS, 2002)

(Figura 6). Segundo Cardoso (1997), no Brasil, a vinagreira foi introduzida provavelmente através do tráfico de escravos.



Figura 6: *Hibiscus sabdariffa* L. Fonte: www.plantamed.com.br

Popularmente conhecida como vinagreira, azedinha, caruru azedo, caruru da guiné, azeda da guiné, quiabo azedo, quiabo roxo, rosélia, quiabo de angola, groselheira (LORENZI; MATOS, 2002), a espécie *H. sabdariffa* apresenta grande valor nutritivo e está presente em diversos continentes (GOMES et al., 2011).

O hibisco é um alimento funcional muito utilizado no Japão, na China, na Coreia, em Taiwan (LIU et al., 2005) e em alguns países africanos. A bebida, popularmente conhecida como zobo na Nigéria, é feita com *H. sabdariffa* e utilizada na medicina popular para o tratamento de hipertensão. Também já se verificou o seu efeito cardioprotetor, antioxidativo e hepatoprotetor em animais (JONADET, 1990). Estes efeitos são ocasionados pelas substâncias antioxidantes como as vitaminas E e C, os ácidos polifenólicos, os flavonoides e as anticianinas (WANG et al., 2000).

No Nordeste do Brasil, principalmente no estado do Maranhão, as folhas são usadas no preparo de diversos pratos típicos da culinária, como o cuxá (LORENZI; MATOS, 2002). Suas folhas também são apreciadas como hortaliça, os frutos e cálices são utilizados no preparo de sucos e geleias, e há variedades que são empregadas na produção de fibras na indústria têxtil e como planta ornamental. Como planta medicinal, suas folhas são usadas como fortificantes e estimulante estomacal e as flores como antibacteriano e antifúngico (ALVES et al., 2007).

Em indivíduos saudáveis, o consumo de *H. sabdariffa* resultou em reduções significativas nas concentrações urinárias de creatinina, ácido úrico,

citrato, tartarato, cálcio, sódio, potássio e de fosfato (ALI et al., 2005). Também já se confirmou que os extratos dessa espécie de planta são caracterizados por um grau muito baixo de toxicidade (AKINDAHUNSI; OLALEYE, 2003).

Olaleye (2007) encontrou efeito antibacteriano desta planta contra *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. aureus* sugerindo que ela possua ação terapêutica notável no tratamento de infecção gastrointestinal, diarreia e doenças da pele, como afirmado por Rogger e colaboradores (1990). A elevada potência de *H. sabdariffa* contra estas bactérias dá base científica para o fato dela já ser usada na medicina popular no tratamento de diversas patologias bacterianas. Nesse trabalho, o extrato da planta foi capaz de inibir o crescimento de *E. coli* resistente a estreptomicina, um antibiótico de largo espectro.

4.7.3. Heteropoliácidos (HPAs)

Os polioxometalatos (POMs) são uma extensa e importante classe de substâncias com estruturas muito simétricas, aos quais podem ser incorporados diversos elementos (TSIGDINOS, 1978). Estruturalmente, os polioxometalatos podem conter ou não heteroátomos, o que divide esta classe de substâncias em dois grupos: (1) os isopoliânions (isopoliácidos – IPAs), de fórmula geral $(M_mO_y)^x$ e (2) os heteropoliânions (heteropoliácidos – HPAs), de fórmula geral $(X_nM_mO_y)^x$ (MAKSIMOV, 1995).

De forma geral, os metais (M) que constituem esta classe de compostos heteropoliácidos são Molibdênio (Mo), Tungstênio (W), ou ainda Vanádio (V), e mais raramente, Nióbio (Nb) ou Tântalo (Ta), em alto estado de oxidação, e o heteroátomo (X) pode ser Silício (Si), Fósforo (P) e Germânio (Ge), entre outros. Essa versatilidade de elementos que podem compor a estrutura garante uma grande variedade de POMs que podem ser sistematicamente estudados (JANSEN et al., 1994).

Em medicina, diversos HPAs têm sido sintetizados, caracterizados e suas atividades biológicas testadas (WANG et al., 2000; LIU et al., 2000; WANG et al., 2001), sendo que as pesquisas na área antiviral e antitumoral dominam a química medicinal destes compostos.

O primeiro relato de POM em atividade antitumoral propôs que uma combinação, chamada PTMC, de fosfotungstato ($H_3[PW_{12}O_{40}]$), fosfomolibdato

($\text{H}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$) e cafeína fosse usada em pacientes que sofriam de carcinoma intestinal. Em quatro pacientes testados, todos tiveram o crescimento do tumor interrompido, sendo que em um deles, os carcinomas foram completamente eliminados (HILL et al., 1998).

Dias e colaboradores (2004a,b) testaram a atividade de alguns heteropoliácidos sobre o crescimento da bactéria *S. aureus* e do fungo leveduriforme *C. albicans* e obtiveram significativo efeito inibitório *in vitro* para o segundo micro-organismo e variável para o primeiro, de acordo com a cepa testada, utilizando meios de cultura líquido e sólido para ambos os micro-organismos. Bau (2007) também testou o heteropoliácido $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ na concentração $15,7\mu\text{mol/mL}$, sobre *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* e obteve efeito inibitório significativo sobre o seu crescimento. Diferentes HPAs também mostraram atividade inibitória sobre o fungo dimórfico *Sporothrix schenckii* (MATHIAS, 2010) e sobre a levedura *M. pachydermatis* (SILVA, 2007).

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. Micro-organismos utilizados

Para todos os ensaios foram utilizadas 2 cepas de cada micro-organismo, sendo 2 cepas clínicas animais de *M. pachydermatis* (MP1 e MP2), uma cepa clínica animal (SA1) e uma padrão ATCC33591 de *S. aureus*, 2 cepas clínicas animais de *S. pseudintermedius* (SP1 e SP2) e uma cepa clínica animal (PA1) e uma padrão ATCC9027 de *P. aeruginosa*. As cepas que apresentarem maior relevância terão seus resultados apresentados nos testes de inibição de crescimento e microscopia óptica e eletrônica.

As cepas clínicas foram isoladas de cães atendidos no setor de Clínica Médica de Pequenos Animais do Hospital Veterinário da UENF. Após inspeção clínica foram coletadas amostras de secreção otológica, com o auxílio de suabes estéreis. Posteriormente, o material foi inoculado em Ágar Sangue (Acumedia) suplementado com 5% de sangue estéril desfibrinado de carneiro, Ágar Sabouraud (Acumedia) com cloranfenicol [50mg/mL] e Ágar MacConkey (Acumedia) para visualização de colônias e suas características morfológicas, bem como as características morfotintoriais. Para tal, as colônias foram coradas pelo método Gram (Laborclin) e foram realizados testes da Catalase (Peróxido de Hidrogênio a 3%), Oxidase (Fluka Chemika) e todos os testes bioquímicos necessários para identificação da espécie isolada. As cepas utilizadas neste trabalho foram confirmadas segundo a espécie pelo uso de kits miniaturizados, Api ID32 Staph (Biomeriéux) para *Staphylococcus* sp. e Api 32GN (Biomeriéux) para *P. aeruginosa*, com leitura automatizada pelo equipamento MiniApi (Biomeriéux).

As cepas de referência utilizadas, pertencentes ao acervo do Laboratório de Sanidade Animal/CCTA/UENF e obtidas das coleções da Fundação Osvaldo Cruz (Rio de Janeiro, RJ), foram reativadas em caldo Broth Heart Infusion (Merck).

5.2. Perfil de resistência aos antimicrobianos

As cepas clínicas isoladas foram testadas frente aos diferentes antibacterianos e antifúngicos mais comumente utilizados no tratamento de otites. Para tal, o teste de Kirby-Bauer foi realizado conforme citado por Owens; Watts (1987) e preconizado pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2012) e a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para a pesquisa de sensibilidade e resistência a drogas.

Resumidamente, as colônias da levedura (incubadas até 48h) e das bactérias (entre 24h de incubação) isoladas e identificadas foram inoculadas em solução salina estéril (NaCl 0,85%) e ajustadas quanto à sua concentração celular por mililitro, de acordo com a leitura no fotômetro (Densimat, bioMérieux) respeitando o valor de 0,5 na escala de McFarland (grau de turbidez que equivale a aproximadamente 1×10^8 UFC/mL). Em seguida, uma alíquota de 100µL do inóculo foi inoculada em ágar Müeller Hinton (Merck), para as bactérias, ou em Ágar Sabouraud, para a levedura *M. pachydermatis*. Após breve período para a secagem da superfície do Ágar, foram colocados os discos de antibiograma e antifungigrama. As placas foram incubadas em estufa 37°C e após 24h (para as bactérias) ou 48h (para a levedura) foram feitas as medições dos diâmetros dos halos, com auxílio de um paquímetro. Os antibacterianos e antifúngicos utilizados estão listados na tabela 1.

Tabela 1: Antibacterianos e antifúngicos utilizados nos antibiogramas e antifungogramas para avaliação do perfil de resistência.

ANTIBACTERIANOS		ANTIFÚNGICOS
<i>Staphylococcus sp.</i>	<i>P. aeruginosa</i>	<i>M. pachydermatis</i>
Tetraciclina (TET 30µg)	Amicacina (AMI 30µg)	Itraconazol (ICZ 10µg)
Enrofloxacina (ENO 5µg)	Ciprofloxacina (CIP 5µg)	Fluconazol (FLU 25µg)
Eritromicina (ERI 15µg)	Enrofloxacina (ENO 5µg)	Miconazol (MCZ 50µg)
Amoxicilina (AMO 10µg)	Gentamicina (GEN 10µg)	Nistatina (NY 100U)
Vancomicina (VAN 30µg)	Tobramicina (TOB 10µg)	Econazol (EC 50µg)
Clindamicina (CLI 2µg)	Cefotaxima (CTX 30µg)	Anfotericina B (AB 100µg)
Florfenicol (FLF 30µg)		Cetoconazol (KET 50µg)
Ampicilina (AMP10µg)		Clotrimazol (CTR 50µg)
Sulfazotrim (SUT 25µg)		
Penicilina (PEN 10U)		
Oxacilina (OXA 1µg)		
Gentamicina (GEN 10µg)		
Neomicina (NEO 30µg)		
Cefalexina (CFX 30µg)		

5.3. Análise Molecular – PCR das cepas de *Staphylococcus spp.*

As cepas clínicas de *S. aureus* e *S. pseudintermedius* utilizadas neste trabalho passaram por análise molecular, tendo o seu DNA extraído utilizando o kit ILUSTRA™ BACTERIA GENOMICPREP MINI SPIN KIT (Healthcare, GE), seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações. Para garantia da qualidade dos experimentos foram utilizadas as seguintes linhagens de referência: *Salmonella enteritidis* ATCC13076 como controle negativo e *S. aureus* ATCC33591 (MRSA) como controle positivo.

As etapas para realização da técnica de PCR estão descritas abaixo:

1º Passo: Coleta da Amostra

- 1) Pegar 3mL de cultura bacteriana;
- 2) Centrifugar por 30 segundos a 16.000xg e após descartar o sobrenadante.

2º Passo: Lise Bacteriana

- 3) Adicionar 40µl de tampão lisozima e homogeneizar em vortex;
- 4) Adicionar 10µl de lisozima (10mg/ml) e homogeneizar em vortex;
- 5) Deixar 5 minutos em temperatura ambiente, homogeneizar em vortex e centrifugar por mais 5 segundos a 1.000xg;
- 6) Deixar 5 minutos em temperatura ambiente, após centrifugar 5 segundos a 1.000xg;
- 7) Adicionar 10µl de proteinase K (10mg/mL) diluído em PBS, homogeneizar em vortex e centrifugar 5 segundos a 1.000xg;
- 8) Deixar 7 minutos a 55°C, homogeneizar em vortex e centrifugar 5 segundos a 1.000xg;
- 9) Deixar 8 minutos a 55°C e centrifugar 5 segundos a 1.000xg.

3º Passo: Purificação das amostras

- 10) Adicionar 500µl do tampão de lise tipo 4 e homogeneizar em vortex;
- 11) Deixar 5 minutos em T°C ambiente, homogeneizar em vortex e centrifugar 5 segundos a 1.000xg;
- 12) Deixar 5 minutos a T°C ambiente;
- 13) Transferir o sobrenadante para a minicoluna (*Collection tube*);
- 14) Centrifugar a 11.000xg por 1 minuto e descartar o que ficou na minicoluna (*Collection tube*).

4º Passo: Lavagem e Secagem das Amostras

- 15) Adicionar 500µl de tampão de lise tipo 4;
- 16) Centrifugar a 11.000xg por 1 minuto e descartar o restante;
- 17) Adicionar 500µl de tampão de lavagem tipo 6;
- 18) Centrifugar a 16.000xg por 3 minutos;
- 19) Transferir a minicoluna para um novo tubo livre de DNase.

5º Passo: Eluição

- 20) Adicionar 200µl do tampão de eluição tipo 5 pré-aquecido a 70°C;
- 21) Incubar a T°C ambiente por 1 minuto;
- 22) Centrifugar a 11.000xg por 1 minuto;
- 23) Guardar o tubo contendo o DNA purificado a -20°C.

Para a reação de PCR foram utilizados os primers GMECAR-1 e GMECAR-2 (quadro 1) e o marcador de peso molecular (Ladder- Ludwig Biotec) de 100pb.

Região	Primer	Sequência (5' a 3')	Localização no Gene	Tamanho do produto amplificado (pb)
MEC	<i>mecA</i>			
	GMECAR-1	ACTGCTATCCACCCTCAAAC	1182-1201	163
GMECAR-2	CTGGGTGAAGTTGTAATCGG	1325-1344		

Quadro 1: Marcador molecular utilizado para amplificação do gene *mecA*.

5.4. Substâncias testadas

As substâncias utilizadas neste trabalho foram fornecidas por colaboradores.

5.4.1. Heteropoliácidos (HPAs)

Estas substâncias foram fornecidas pelo Prof^o Luis César Passoni do LCQUI/CCT/UENF.

Os sais de HPAs utilizados neste trabalho foram:

Ag₃[PW₁₂O₄₀]: Dodecatungstofosfato de Prata;

Ag₃[PMo₁₂O₄₀]: Dodecamolibdofosfato de Prata ;

Ag₄[SiW₁₀V₂O₄₀]: Decatungstosilicato de Prata;

Ag₄[SiW₁₂O₄₀]: Dodecatungstosilicato de Prata.

5.4.2. Extratos de *C. baccatum* var. *pendulum*

Amostras de frações de extratos brutos do fruto seco da planta foram fornecidas pelo Prof^o Ivo José Curcino Vieira do LCQUI/CCT/UENF.

As frações utilizadas neste trabalho foram obtidas das populações P1, P2 e F1: IP1, IP2, IIP1, IIP2, IIF1, IIIP1, IIIP2, IIIF1.

Além dos extratos de *C. baccatum*, a sua substância ativa purificada, Capsaicina (Sigma®), também foi utilizada como controle.

5.4.3. Extrato bruto de *H. sabdariffa* L. (EbHs)

Amostra de extrato bruto metanólico do cálice da planta foi fornecida pela Prof^a Lanamar de Almeida Carlos da Universidade Federal de São João Del Rei - UFSJ, Campus Sete Lagoas.

5.5. Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Diluição em caldo

Este teste foi utilizado para avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e ainda para medir a concentração mínima inibitória destas substâncias.

Segundo Neder (1992), este é um método que apresenta resultados satisfatórios, através da contagem de colônias, que é expressa pelo número de bactérias/leveduras por mililitro de cultura.

Foi preparada uma solução de inóculo com densidade óptica igual a $0,1 \times 10^8$ McFarland, segundo leitura realizada pelo fotômetro. Com o auxílio de uma micropipeta, um volume de 180µL de caldo Sabouraud dextrose (para a levedura) e de caldo Muller Hinton + 2% de glicose (para as bactérias) foi distribuído a três tubos eppendorf, uma vez que os ensaios foram realizados em triplicata. Em seguida, 20µL da solução de inóculo do micro-organismo foi adicionada em cada tubo. Estes três tubos receberam os rótulos “controle (-)”. Em outros três tubos, rotulados como “controle (+)”, foram adicionados 170µL de caldo, 20µL da solução D.O. 0.1 de micro-organismo e 10µL do antifúngico miconazol [0,05mg/mL] (para a levedura) e do antibiótico gentamicina

[10µg/mL] (para as bactérias). Nos tubos rotulados como tratamento foram adicionados 10µL dos compostos testados em diferentes concentrações.

Após estes procedimentos os tubos foram incubados em estufa a 37°C, por 8h para as bactérias e 60h para a levedura. Após esse período, uma alíquota de 100µL de cada tubo eppendorf foi plaqueada, com o auxílio de um suabe estéril, em placa contendo ágar Sabouraud (para a levedura) e ágar Müller Hinton (para as bactérias).

As placas foram novamente incubadas a 37°C, e após 12h para as bactérias e 48h para a levedura, foi realizada a contagem de colônias de cada placa. A concentração mínima inibitória do composto utilizado foi aquela onde a contagem de colônias indicou o crescimento entre 30 a 300 colônias/100µL de cultura. Os ensaios foram realizados em triplicata e com duas repetições.

5.6. Ensaio de inibição em meio líquido com os HPAs

5.6.1. Inibição em meio líquido em tempo inicial de crescimento

Esta etapa foi também denominada tempo zero. Foi preparada uma solução de inóculo com densidade óptica igual a $0,5 \times 10^8$ McFarland, segundo leitura realizada pelo fotômetro. Com o auxílio de uma micropipeta, um volume de 1900µL de caldo Sabouraud dextrose (para a levedura) e de caldo Muller Hinton + 2% de glicose (para as bactérias) foi distribuído a três tubos de ensaio, uma vez que os ensaios foram realizados em triplicata. Em seguida, 100µL da solução de inóculo do micro-organismo foi adicionada em cada tubo. Estes três tubos receberam os rótulos “controle (-)”. Em outros três tubos, rotulados como “controle (+)”, foram adicionados 1800µL de caldo, 100µL da solução D.O. $0,5 \times 10^8$ McFarland de micro-organismo e 100µL do antifúngico miconazol [0,05mg/mL] (para a levedura) e do antibiótico gentamicina [10µg/mL] (para as bactérias). Nos tubos rotulados como tratamento foram adicionados 100µL dos HPAs na concentração final de 0,028µmol/mL.

Após estes procedimentos os tubos foram incubados a 37°C, sendo realizadas leituras periódicas de densidade óptica até que o aparelho atingisse sua capacidade máxima de leitura (D.O. $7,5 \times 10^8$ McFarland). Os ensaios foram realizados em triplicata e com duas repetições.

5.6.2 Inibição em meio líquido em fase exponencial de crescimento

A metodologia deste experimento é a mesma descrita acima, no item 5.4.1, porém o tratamento foi iniciado após o período de crescimento exponencial, que variou de acordo com o micro-organismo testado.

5.7. Permeabilização das Membranas

As células tratadas e não tratadas (controle) foram incubadas com o corante vital SYTOX® Green que possui alta afinidade para ácidos nucleicos e penetra em células apenas quando sua membrana está danificada. Este ensaio permitiu medir o dano causado pelas substâncias com atividade antimicrobiana através da permeabilização da membrana plasmática como descrito por Thevissen et al. (1999) com algumas modificações. O SYTOX® Green é um corante vital que possui alta afinidade para ácidos nucleicos e penetra em células apenas quando sua membrana está danificada.

Imediatamente após o ensaio de inibição com os compostos, os tubos eppendorf foram centrifugados a 8000xg por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e ao centrifugado foi adicionado 20µL do corante fluorescente SYTOX® Green a uma concentração final de 0,2M. Após 30 minutos de incubação, as células foram analisadas em microscópio (Axiophoto Zeiss, Alemanha), equipado com um conjunto de filtros de fluorescência para a detecção de fluoresceína (450-490nm, comprimento de onda de emissão de 500 nm).

5.8. Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As células tratadas e não tratadas (controle) foram processadas para a análise por microscopia eletrônica de transmissão para analisar a morfologia e estrutura das células após os tratamentos com os compostos que apresentaram atividade antimicrobiana.

As amostras foram fixadas por duas horas à temperatura ambiente em glutaraldeído 2,5% grau II (Sigma®), diluído em tampão cacodilato 0,1M pH

7.4. Após a fixação, as amostras foram lavadas 3 vezes por 5 min no mesmo tampão e pós-fixadas por 20 minutos em tetróxido de ósmio 1% (O_5O_4 , Sigma®) adicionado de 0,8% de ferrocianeto de potássio (Sigma®), para as bactérias. Para a levedura, a pós-fixação foi feita com permanganato de potássio 1,5%. Em seguida, as células foram lavadas com o mesmo tampão e desidratadas por 20 minutos em séries crescentes de acetona\água destilada (Merck®): 15%, 30%, 50%, 70%, 90% e 100% por três vezes. Logo depois as amostras foram infiltradas lentamente em séries crescentes de acetona e resina epóxi (Epon Poly Bed 812 – PolyScience®), para as bactérias, e resina Spurr (Sigma®) para a levedura, iniciando em concentrações decrescentes de acetona:resina 3:1, 2:1, 1:1, e depois crescentes 1:2, 1:3 e finalmente incluídas em resina pura. Após o emblocamento das amostras, as mesmas foram colocadas em estufa a 60°C para polimerização por 48h para as bactérias e 12 horas para as leveduras e os blocos obtidos foram cortados em Ultramicrótomo Reichert Ultracut (Leica®). Os cortes ultrafinos foram coletados em grades de cobre (300 mesh), contrastados em acetato de uranila e citrato de chumbo durante 20 e 5 minutos, respectivamente, e lavados gentilmente em água destilada. Depois de secos, os cortes estavam prontos para visualização ao Microscópio Eletrônico de Transmissão Zeiss 900, a 80 KV.

5.9. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As células tratadas e não tratadas (controle) foram processadas para a análise por microscopia eletrônica de varredura para observar se os tratamentos impediram a formação do biofilme.

A metodologia foi a mesma utilizada por Moreira et al. (2012), onde as cepas foram incubadas por 48/72h a 37°C em caldo MH/YEPD, sobre lamínulas de vidro dentro de poços de uma microplaca de 24 poços. Após a incubação, cada lamínula de vidro com os micro-organismos aderidos, foi lavada três vezes durante 15 minutos com solução PBS 0,05M. Em seguida, foram fixadas com glutaraldeído a 2% (p/vol) diluído em tampão cacodilato 0.1M (pH 7,4), à temperatura ambiente, durante 16 horas. Em seguida, foram lavadas novamente com o mesmo tampão. Na sequência, as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de etanol\água destilada (30%,

50%, 70%, 90% [vol/vol]) durante 20 minutos cada e depois três vezes em etanol absoluto pelo mesmo tempo. Após a desidratação, as amostras foram secas em ponto crítico e montadas em stubs com o auxílio de uma fita adesiva dupla face de carbono e revestida por pulverização com paládio. As amostras depois de metalizadas estavam prontas para serem visualizadas em MEV (Zeiss DSM - 912 a 15 KV) para observação das estruturas do biofilme.

5.10. Análises Estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância e à comparação de médias pelo teste de Tukey ($p \leq 0,05$) em nível de 5% de significância em todas as variáveis. Foi feita análise de regressão linear e quadrática para todos os tratamentos. O programa utilizado para as análises foi o SAEG.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

6.1. Perfil de resistência aos antimicrobianos das cepas estudadas

Para análise do perfil de resistência, as amostras clínicas estudadas foram testadas frente aos principais antimicrobianos utilizados no tratamento de otites.

O resultado do antibiograma das cepas clínicas de *M. pachydermatis* está descrito na tabela 2:

Tabela 2: Perfil de resistência de *M. pachydermatis* aos agentes antifúngicos pelo método difusão em Agar.

	Antifúngicos							
	ICZ	FLU	MCZ	NY	EC	AB	KET	CTR
MP1	S	R	S	S	S	S	S	S
MP2	S	I	S	S	S	S	S	S

Os azóis são considerados a principal classe de antifúngicos, surgindo primeiramente com o uso tópico e posteriormente foram lançados os de uso sistêmico. Nesta classe antifúngica não há recomendação expressa para realização de teste antes do tratamento, mesmo frente ao fluconazol, o triazólico mais implicado em casos de resistência em infecções humanas (PFALLER et al., 1994). Um dos principais elementos responsáveis por isso foi a pandemia da AIDS, uma vez que os azóis representaram opção terapêutica menos tóxica e mais cômoda que a anfotericina B, pois frequentemente os indivíduos acometidos por candidíase oral e esofágica faziam uso de fluconazol por tempo prolongado, conseqüentemente inúmeros relatos de resistência de *C. albicans* ao fluconazol em pacientes com Aids foram descritos (MILLON et al., 1994). O uso indiscriminado de antifúngicos também atingiu a clínica de pequenos animais, onde se passou a observar o aumento da resistência a alguns antifúngicos (NASCENTE et al., 2009).

No presente trabalho foi observada resistência em uma das cepas estudadas e sensibilidade intermediária na outra ao fluconazol. Cafarchia e colaboradores (2012) avaliando o efeito de alguns azóis sobre 62 isolados de *M. pachydermatis* oriundos de cães, encontraram maior susceptibilidade ao

cetoconazol e itraconazol, e menor ao miconazol e fluconazol. Uma boa resposta clínica ao fluconazol tem sido observada em pacientes com lesões extensas, no entanto, devido à falta de efeito fungicida deste triazol, já que este é fungistático, a sua eliminação incompleta pode causar recorrência (NIJIMA et al., 2011). Em consequência de um tratamento prolongado e repetitivo, pode-se criar resistência da levedura a esse antifúngico (FERA et al., 2009). No estudo de Jesus e colaboradores (2011), foi demonstrada a capacidade de *M. pachydermatis* em adquirir resistência ao fluconazol quando submetidas a uma exposição prolongada ao fármaco e que este fenômeno foi também responsável pela resistência cruzada a outros azóis.

O resultado do antibiograma das cepas de *Staphylococcus* spp. está descrito na tabela 3:

Tabela 3: Perfil de resistência de *Staphylococcus* spp. os agentes antibacterianos pelo método difusão em Agar.

	Antibacterianos													
	TET	ENO	ERI	AMO	VAN	CLI	FLF	AMP	SUT	PEN	OXA	GEN	NEO	CFX
SA1	S	S	S	R	S	S	S	R	S	R	S	S	S	S
33591	R	S	R	R	S	R	S	R	R	R	R	S	S	R
SP1	S	S	R	R	S	I	S	R	R	R	S	S	I	S
SP2	R	S	S	R	S	S	S	R	R	R	S	S	S	S

A resistência aos agentes antimicrobianos comumente utilizados no tratamento das diversas infecções por *Staphylococcus* spp. tem sido relatada cada vez mais frequentemente (WOODFORD, 2005). No presente trabalho foi observado que as quatro cepas estudadas apresentaram resistência à penicilina, amoxicilina e ampicilina. E todas foram sensíveis a enrofloxacin, vancomicina, florfenicol e gentamicina.

Rougier e colaboradores (2005), verificaram que *Staphylococcus* spp. isolados de cães com otite externa são mais sensíveis à enrofloxacin (90,4%) e à gentamicina (95,2%), semelhante ao encontrado neste trabalho. Yamashita e colaboradores (2004) verificaram a resistência de cepas de *Staphylococcus* sp. isoladas também de cães com otite externa, obtendo os seguintes valores em ordem decrescente: 56,3% de resistência à penicilina; 54,7% à ampicilina, 14,1% à eritromicina, 3,1% à tetraciclina e 1,6% à gentamicina.

O resultado do antibiograma das cepas de *P. aeruginosa* está descrito na tabela 4:

Tabela 4: Perfil de resistência de *P. aeruginosa* os agentes antibacterianos pelo método difusão em Agar.

Antibacterianos						
	AMI	CIP	ENO	GEN	TOB	CTX
PA1	S	S	S	S	S	R
9027	S	S	S	S	S	R

A existência de *P. aeruginosa* multirresistente já foi constatada por diversos autores (PETERSEN et al., 2002; MONDINO, 2005; TULESKI, 2007). No presente estudo observou-se resistência das duas cepas estudadas à cefotaxima. As taxas de resistência à cefotaxima entre bacilos Gram-negativos são de 18,6% na China e 19% no Japão (ZHANG et al., 2001). No trabalho de Soares (2005), das 162 amostras clínicas de *P. aeruginosa* analisadas, 69,1% foram resistentes à cefotaxima, sendo a maior porcentagem de resistência entre os 11 antimicrobianos testados. Isso ocorre provavelmente devido à produção de β -lactamases e o uso indiscriminado de antimicrobianos. Em espécies como *Enterobacter* sp., *Citrobacter* sp. e *Pseudomonas* sp., as β -lactamases são normalmente produzidas em pequenas quantidades, porém a produção pode aumentar significativamente quando os micro-organismos são expostos a algum β -lactâmico (SADER et al., 1998).

Oliveira e colaboradores (2005) verificaram que cepas de *P. aeruginosa* foram mais sensíveis às seguintes drogas: ciprofloxacina (97,1%), tobramicina (85,9%), enrofloxacin (73,3%), amicacina (59,7%) e gentamicina (53,3%).

6.2. Análise molecular (PCR) das amostras clínicas de *Staphylococcus* spp.

Apesar das amostras clínicas de *Staphylococcus* sp. não terem apresentado perfil fenotípico de resistência à oxacilina, estas foram submetidas à análise molecular pela técnica de PCR para amplificação do gene *mecA*. Com o resultado do gel de agarose, pode-se observar que a cepa clínica de *S. pseudintermedius* SP2 foi positiva para a presença do gene *mecA* (Figura 7).

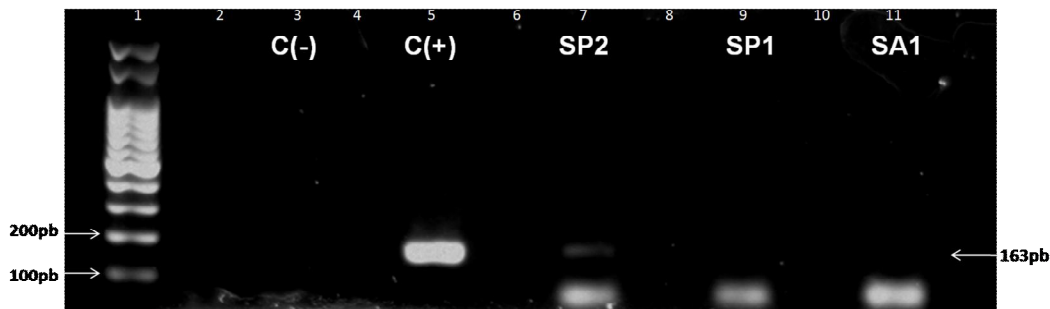


Figura 7: Resultado do gel de agarose 5% por eletroforese: 1 - 100 bp DNA ladder (Ludwig, Biotec, Brazil); 2, 4, 6, 8, 10: Vazio; 3 - C(-) Controle negativo *Salmonella enteritidis* ATCC13076 strain; 5 - C(+) Controle positivo *S. aureus* ATCC33591 strain; 7 - SP2 Cepa clínica *S. pseudintermedius*; 9 - SP1 Cepa clínica *S. pseudintermedius*; 11 - Cepa clínica SA1 *S. aureus*.

Cepas de *Staphylococcus* sp. resistentes à meticilina têm sido consideradas uma ameaça à saúde pública, uma vez que causam infecções em seres humanos e muitas vezes apresentam múltipla resistência aos antimicrobianos (STRUELENS et al., 2009), principalmente pelo surgimento de cepas MRSA humanas atípicas quanto ao seu perfil resistência e suscetibilidade frente a diferentes antimicrobianos, entre eles a oxacilina (HOSOSAKA et al., 2007; GIANNOULI et al., 2010; JANNATI et al., 2013). Além da grande importância em humanos, estas cepas têm sido isoladas de cães em diversos países (MORRIS et al., 2006; HANSELMAN et al., 2008; WEESE et al., 2010).

MRSP tem sido cada vez mais investigado em Medicina Veterinária. Recentemente, um estudo realizado na Europa concluiu que MRSP é um patógeno hospitalar em ambientes veterinários em uma forma similar às linhagens de MRSA em Medicina (PERRETEN et al., 2010).

A frequência de MRSP tem sido estudada em populações de cães em diversos países, com taxas que variam de 0-4,5% em cães na comunidade e 0-7% em cães doentes (DUIJKEREN et al., 2011). No Brasil foi verificado um aumento da incidência desses micro-organismos no estado do Rio de Janeiro, com dados de 4,6% em 2000 passando para 10,8% em 2013, fato este que chama a atenção dos clínicos veterinários para efetivarem os tratamentos de infecções causadas por MRSP (LILENBAUN et al., 2000; PENNA et al., 2013). Em um estudo na Alemanha, a prevalência de MRSP em 16.103 espécimes

clínicos de animais foi de 0,8% em cães (61/7.490), 0,1% em gatos (6/3.903) e 0,1% em cavalos (5/4.710), sendo a pele e as orelhas os locais mais comuns da infecção por MRSP (RUSCHER et al., 2009). No trabalho de Penna e colaboradores (2013), foram isoladas 282 cepas de *Staphylococcus* spp de cães saudáveis, com piодermite e otite. Dessas, 36 foram fenotipicamente resistentes à metililina e analisadas pela técnica do PCR para detecção do gene *mecA*, sendo este detectado nas 36 amostras. No caso das amostras sensíveis à metililina, 7 também tiveram o gene detectado, sendo 1 delas proveniente de otite.

Neste trabalho o isolamento de estirpes de *S. pseudintermedius* de cães com otite e que resultaram sensíveis à oxacilina no antibiograma, uma amostra foi positiva para o gene *mecA* (OS-MRSP). Esta amostra apresentou resistência a cinco antimicrobianos e sensibilidade a nove do total testado. Este resultado pode imprimir mais um fator de risco para pessoas que entram em contato com bactérias que apresentam este tipo de perfil, pelo fato do gene *mecA* estar presente e se tornarem resistentes durante o curso da terapia antimicrobiana (HOSOSAKA et al. 2007; KAMPF et al., 2003). Contudo, em estirpes atípicas de MRSA de origem humana, sensíveis à oxacilina foi demonstrado que a amplificação do gene *mecA* não é um fator determinante absoluto de resistência à oxacilina e que esta característica pode estar associada a mutações na bactéria, principalmente na quantidade de aminoácidos que compõem as proteínas Fem de *S. aureus*, que é um fator essencial para a restência à metililina (GIANNOULI et al., 2010).

6.3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) – Diluição em caldo

6.3.1. CIM com extratos de *C. bacatum* e *H. sabdariffa* (EbHs) sobre *M. pachydermatis* (MP1)

Após 48h de incubação da levedura *M. pachydermatis*, observou-se o crescimento confluyente na placa do controle (-) e a ausência de crescimento na do controle (+) com miconazol [0,05mg/mL] (Figuras 8A e 8B). No tratamento com capsaicina [0,05mg/mL], o crescimento de colônias ficou entre 30 e 300, indicando esta concentração como inibitória mínima para a levedura (Figura

8C). Nos tratamentos com EbHs, após serem testadas diferentes concentrações, a que apresentou crescimento entre 30 e 300 colônias foi [3,15mg/mL] (Figura 8D). Nos tratamentos com os extratos de *C. baccatum*, as frações IIP1, IIP2 e IIF1 apresentaram CMI de [20mg/mL] (Figuras 8E a 8G). As demais frações apresentaram crescimento superior a 300 colônias nesta mesma concentração (Figuras 8H a 8L).

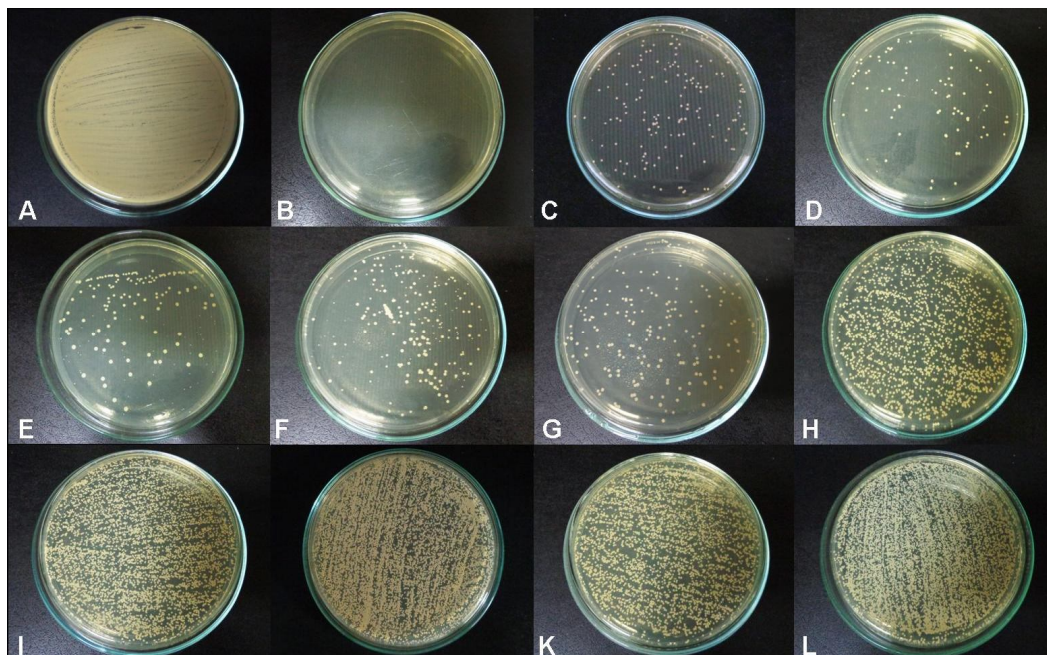


Figura 8: Crescimento de colônias de *Malassezia pachydermatis* após 48h de incubação: (A) Controle (-); (B) Controle (+) com miconazol [0,05mg/mL]; (C) Capsaicina [0,05mg/mL]; (D) extrato de *H. sabdariffa* (EbHs) [3,15mg/mL]; (E) extrato de *C. baccatum* IIP1 [20mg/mL]; (F) extrato de *C. baccatum* IIP2 [20mg/mL]; (G) extrato de *C. baccatum* IIF1 [20mg/mL]; (H) extrato de *C. baccatum* IP2 [20mg/mL]; (I) extrato de *C. baccatum* IP1 [20mg/mL]; (J) extrato de *C. baccatum* IIP1 [20mg/mL]; (K) extrato de *C. baccatum* IIP2 [20mg/mL]; (L) extrato de *C. baccatum* IIF1 [20mg/mL].

Não há relatos na literatura da utilização de extrato de *H. sabdariffa* e de *C. baccatum* sobre leveduras do gênero *Malassezia* sp., porém Rukayadi e colaboradores (2008) testaram os extratos metanólicos de 23 plantas medicinais contra seis espécies de *Candida* sp., tendo o extrato de *H. sabdariffa* apresentado atividade antifúngica sobre *C. albicans*. Já no trabalho de Olaleye (2007) o extrato do cálice da mesma planta foi incapaz de inibir *C. albicans*, mesmo resultado encontrado por Santos (2013).

Kappel e colaboradores (2008) testaram a atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da semente de *C. baccatum* sobre diferentes micro-

organismos, dentre eles *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *Cryptococcus neoformans*. Os halos de inibição obtidos variaram entre 10 e 13mm de diâmetro. Comparando os halos de inibição formados pelos diferentes antifúngicos existentes, estes autores concluíram que a atividade antimicrobiana do extrato sobre esses fungos foi fraca. Diz e colaboradores (2006) extraíram três peptídeos da semente de outra espécie do gênero *Capsicum*, *C. annuum*, e testaram sobre diversos micro-organismos. A fração F1 exerceu intensa atividade antifúngica sobre *C. albicans* e *Saccharomyces cerevisiae*, promovendo inclusive algumas alterações morfológicas, comprovadas por microscopia de transmissão e de fluorescência. O trabalho de Ribeiro e colaboradores (2007) teve como objetivo isolar e caracterizar peptídeos presentes em sementes de pimenta e avaliar a sua toxicidade em meio líquido contra algumas espécies de leveduras. Uma fração, rica em peptídeos, foi capaz de inibir o crescimento das leveduras *S. cerevisiae*, *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Em contrapartida, Santos (2010) testando extrato de *C. annuum* e capsaicina, chegou à conclusão que *C. albicans* não foi inibida por nenhum dos tratamentos.

6.3.2. CIM com extratos de *C. baccatum* e *H. sabdariffa* (EbHs) sobre *S. aureus* ATCC33591

Após 12h de incubação de *S. aureus*, observou-se o crescimento confluyente na placa do controle (-) e a ausência de crescimento na do controle (+) com gentamicina [10µg/mL] (Figuras 9A e 9B). Assim como no controle (-) o tratamento com capsaicina [0,05mg/mL] também formou crescimento confluyente nas placas (Figura 9C). Nos tratamentos com EbHs, a concentração que apresentou crescimento entre 30 e 300 colônias foi [5,3mg/mL] (Figura 9D). Nos tratamentos com os extratos de *C. baccatum*, na máxima concentração disponível [25mg/mL], nenhuma das frações testadas apresentou efeito inibitório satisfatório sobre a bactéria (Figuras 9E a 9L).

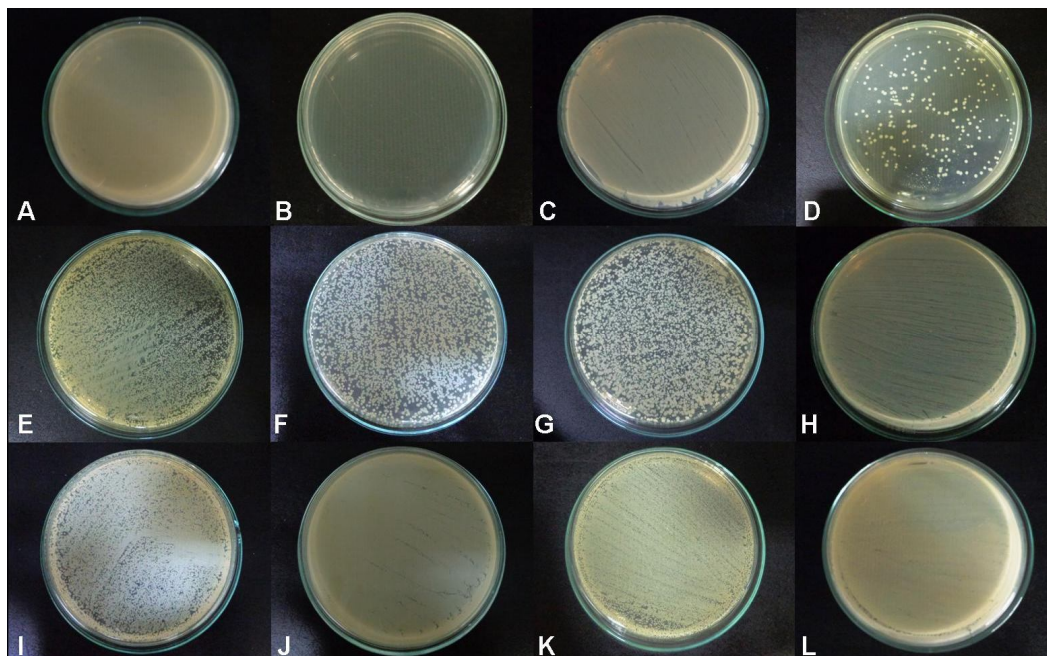


Figura 9: Crescimento de colônias de *Staphylococcus aureus* após 12h de incubação: (A) Controle (-); (B) Controle (+) com gentamicina [10µg/mL]; (C) Capsaicina [0,05mg/mL] ; (D) extrato de *H. sabdariffa* (EbHs) [5,3mg/mL] ; (E) extrato de *C. baccatum* IIP1 [25mg/mL] ; (F) extrato de *C. baccatum* IIP2 [25mg/mL] ; (G) extrato de *C. baccatum* IIF1 [25mg/mL] ; (H) extrato de *C. baccatum* IP2 [25mg/mL] ; (I) extrato de *C. baccatum* IP1 [25mg/mL] ; (J) extrato de *C. baccatum* IIP1 [25mg/mL] ; (K) extrato de *C. baccatum* IIP2 [25mg/mL] ; (L) extrato de *C. baccatum* IIF1 [25mg/mL] ;

No trabalho de Olaleye (2007) foi testado o efeito antimicrobiano do extrato do cálice de *H. sabdariffa* pela técnica de diluição seriada, e encontrou-se para *S.aureus* a concentração mínima inibitória de 0,3mg/mL. Esse autor sugere que a atividade antimicrobiana desse extrato possui grande potencial na área farmacológica. Wong e colaboradores (2010) testando o extrato das folhas dessa mesma planta e utilizando a técnica de difusão em disco, encontraram para essa bactéria a concentração mínima inibitória de 2mg/mL. Os autores sugerem que o extrato de *H. sabdariffa* poderá, no futuro, ser considerado um agente antibacteriano natural de largo espectro. No presente trabalho a concentração de EbHs foi bem maior, 106mg/mL, lembrando que os extratos, apesar de serem da mesma planta, tiveram origens diferentes.

No trabalho de Jung e colaboradores (2013) foi feita a análise físico-química de *H. sabdariffa*, e o resultado encontrado é que esta planta é rica em ácido málico, antocianinas, ácido ascórbico e sais minerais, especialmente o Ca e Fe, podendo ser uma boa fonte de antioxidantes naturais. Neste mesmo

trabalho também foi avaliada a atividade antimicrobiana do extrato etanólico desta planta, pelo método de impregnação em disco. O extrato etanólico na concentração 25mg/mL foi capaz de inibir o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*.

Em 2008, Kappel e colaboradores testaram a atividade antimicrobiana de *C. baccatum* var. *pendulum*, sobre diferentes micro-organismos, dentre eles *S. aureus*, pelo método de difusão em ágar, porém o extrato não formou halo de inibição sobre esse micro-organismo.

6.3.3. CIM com extratos de *C. baccatum* e *H. sabdariffa* (EbHs) sobre *S. pseudintermedius* (SP2)

Após 12h de incubação de *S. pseudintermedius*, observou-se o crescimento confluyente na placa do controle (-) e a ausência de crescimento na placa do controle (+) com gentamicina [10µg/mL] (Figuras 10A e 10B). No tratamento com capsaicina [0,05mg/mL], houve o crescimento de incontáveis colônias nas placas (Figura 10C). Assim como com *S. aureus*, a CIM do EbHs foi [5,3mg/mL] (Figura 10D) e nos tratamentos com as diferentes frações de *C. baccatum*, nenhuma delas apresentou efeito inibitório satisfatório sobre esta bactéria (Figuras 10E a 10L).

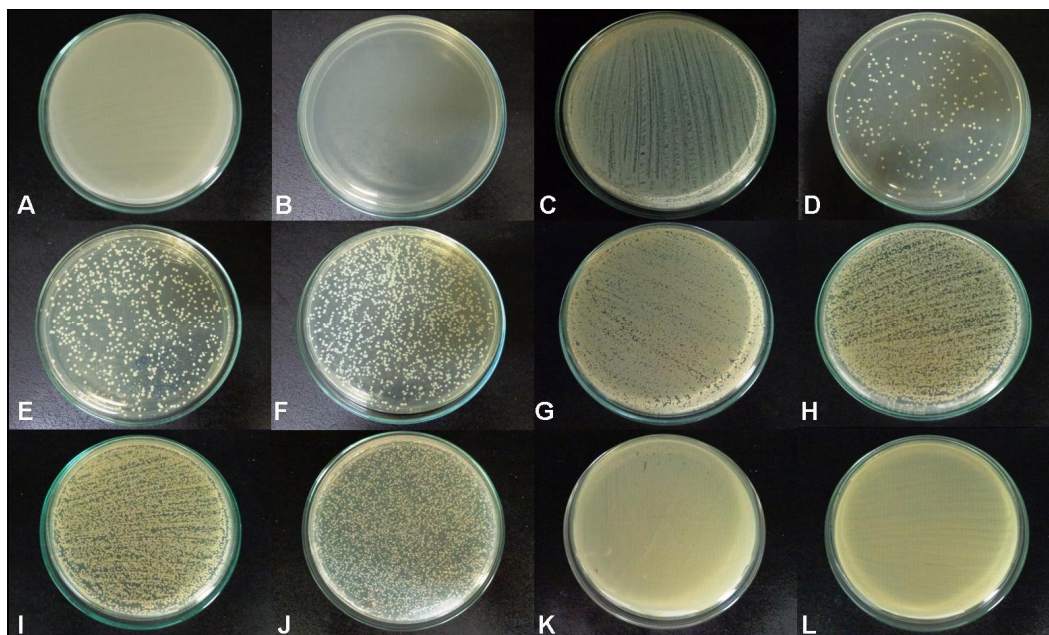


Figura 10: Crescimento de colônias de *Staphylococcus pseudintermedius* após 12h de incubação: (A) Controle (-); (B) Controle (+) com gentamicina [10µg/mL]; (C) Capsaicina [0,05mg/mL]; (D) extrato de *H. sabdariffa* (EbHs) [5,3mg/mL]; (E) extrato

de *C. baccatum* IIP1 [25mg/mL] ; (F) extrato de *C. baccatum* IIP2 [25mg/mL] ; (G) extrato de *C. baccatum* IIF1 [25mg/mL] ; (H) extrato de *C. baccatum* IP2 [25mg/mL] ; (I) extrato de *C. baccatum* IP1 [25mg/mL] ; (J) extrato de *C. baccatum* IIP1 [25mg/mL] ; (K) extrato de *C. baccatum* IIP2 [25mg/mL] ; (L) extrato de *C. baccatum* IIF1 [25mg/mL] .

Não há relatos na literatura da utilização de extrato de *H. sabdariffa* e de *C. baccatum* sobre *S. pseudintermedius*, mas como citado anteriormente, outros autores já testaram a atividade antimicrobiana dessas plantas sobre bactérias do gênero *Staphylococcus* sp.

6.3.4. CIM com extratos de *C. baccatum* e *H. sabdariffa* (EbHs) sobre *P. aeruginosa* ATCC9027

Após 12h de incubação de *P. aeruginosa*, observou-se o crescimento confluyente na placa do controle (-) e a ausência de crescimento na do controle (+) com gentamicina [10µg/mL] (Figuras 11A e 11B). Assim como no controle (-) o tratamento com capsaicina [0,05mg/mL] também formou crescimento confluyente nas placas (Figura 11C). Assim como com *S. aureus* e *S. pseudintermedius*, a CMI do EbHs foi [5,3mg/mL] (Figura 11D) e nos tratamentos com as diferentes frações de *C. baccatum*, nenhuma delas apresentou efeito inibitório sobres as bactérias, apresentando crescimento confluyente em todos os tratamentos (Figuras 11E a 11L).

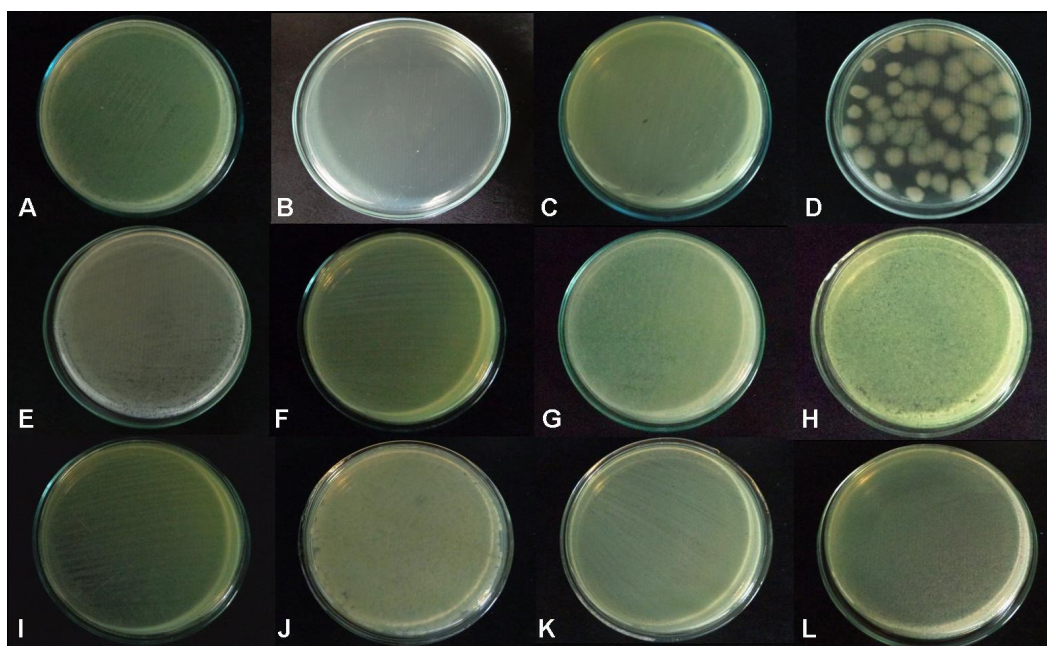


Figura 11: Crescimento de colônias de *Pseudomonas aeruginosa* após 12h de incubação: (A) Controle (-); (B) Controle (+) com gentamicina [10µg/mL]; (C) Capsaicina [0,05mg/mL] ; (D) extrato de *H. sabdariffa* (EbHs) [5,3mg/mL] ; (E) extrato de *C. baccatum* IIP1 [25mg/mL] ; (F) extrato de *C. baccatum* IIP2 [25mg/mL] ; (G) extrato de *C. baccatum* IIF1 [25mg/mL] ; (H) extrato de *C. baccatum* IP2 [25mg/mL] ; (I) extrato de *C. baccatum* IP1 [25mg/mL] ; (J) extrato de *C. baccatum* IIP1 [25mg/mL] ; (K) extrato de *C. baccatum* IIP2 [25mg/mL] ; (L) extrato de *C. baccatum* IIF1 [25mg/mL] .

Ali e colaboradores (2005) em seus estudos fitoquímicos e farmacológicos utilizando o óleo extraído de sementes de *H. sabdariffa*, demonstraram que essa parte da planta não possui efeito inibitório sobre *P. aeruginosa*. Já no trabalho de Olaleye (2007), utilizando o extrato de cálice da planta pela técnica de diluição seriada, achou para *P. aeruginosa* a concentração mínima inibitória de 1,3mg/mL. Wong e colaboradores (2010) trabalhando com extrato metanólico de folhas de *H. sabdariffa* e usando o método de difusão em disco, na concentração de 2mg/mL, conseguiram uma zona de inibição de 9mm. Santos (2013) encontrou concentração mínima inibitória de 127mg/mL, tanto para *S. aureus* quanto para *P. aeruginosa*.

Kappel e colaboradores (2008) testaram a atividade antimicrobiana de *C. baccatum* var. *pendulum*, sobre algumas bactérias, dentre elas *P. aeruginosa*, pelo método de difusão em ágar. O extrato de *C. baccatum* não foi capaz de formar halo de inibição sobre nenhuma das bactérias testadas. Cruz e colaboradores (2003) descreveram que a intensidade da atividade

antibacteriana das espécies de *Capsicum* spp. está diretamente relacionada com sua pungência e concentração de capsaicínoides.

Santos (2010) testando o extrato de *C. annuum* em acetato de etila, capsaicina e seus análogos sobre *Streptococcus mutans* e *P. aeruginosa*, observou que a capsaicina e seus análogos apresentaram efeito significativo para ambos os micro-organismos, mas o extrato da planta apenas foi capaz de inibir *S. mutans*.

6.4. Ensaio de inibição em meio líquido em tempo inicial de crescimento

6.4.1. Ensaio de inibição em meio líquido de *M. pachydermatis* (MP1) na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 0h

Observou-se que $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ exibiu 98% de inibição, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ 97% e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ 96%, enquanto o antifúngico miconazol apresentou 100% de inibição sobre o crescimento da levedura. Já o HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor efeito, 44% de inibição sobre o crescimento de *M. pachydermatis*. Os resultados estão apresentados na figura 12.

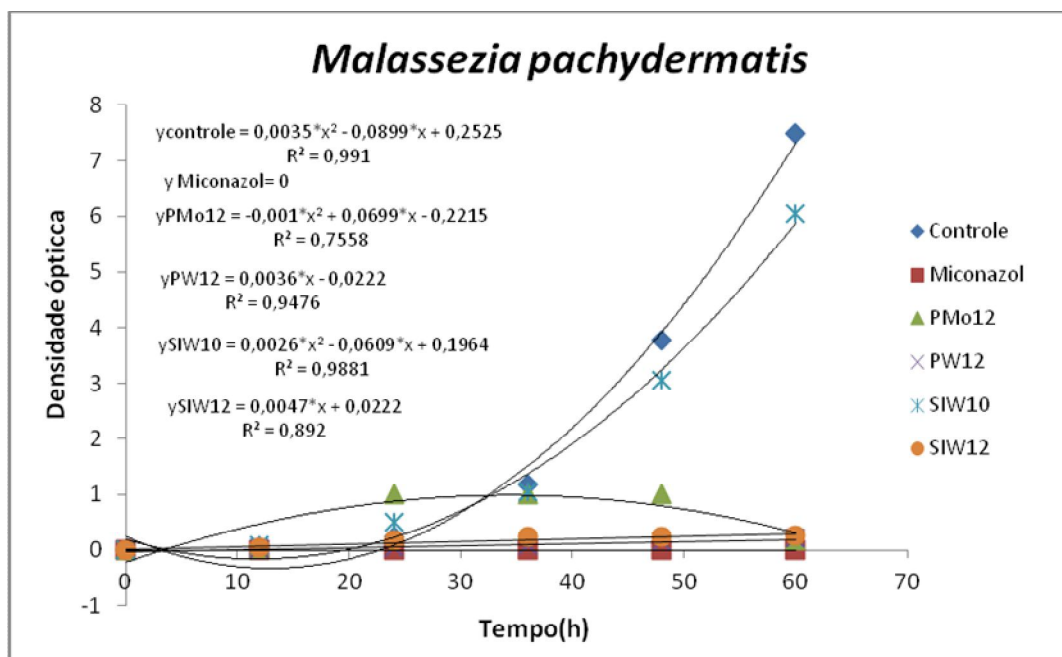


Figura 12: Curva de crescimento de *M. pachydermatis* (MP1) na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 0h.

Os dados da tabela 5 mostram que $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor inibição comparado aos demais tratamentos, e foi estatisticamente diferente do grupo controle. Os tratamentos com $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ não diferiram entre si, e por sua vez $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ não diferiu de $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$. O tratamento com miconazol apresentou o melhor resultado de inibição, diferindo dos demais tratamentos.

Tabela 5. Crescimento em meio líquido de *M. pachydermatis* (MP1) na presença de miconazol, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 0h.

Tratamentos	Médias	Comparações
Controle	3.3333	A
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$	1.7528	B
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$.1333	C
$\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$.0944	C D
$\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$.0806	D
Miconazol	.0000	E

As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (5%).

6.4.2. Ensaio de inibição em meio líquido de *S. aureus* ATCC33591, na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 0h

Observou-se que $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ exibiram efeito de 100% de inibição sobre o crescimento de *S. aureus*, equivalendo-se ao controle positivo com gentamicina. Já o HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor efeito de inibição, 49%, sobre o crescimento da bactéria. Os resultados estão apresentados na figura 13.

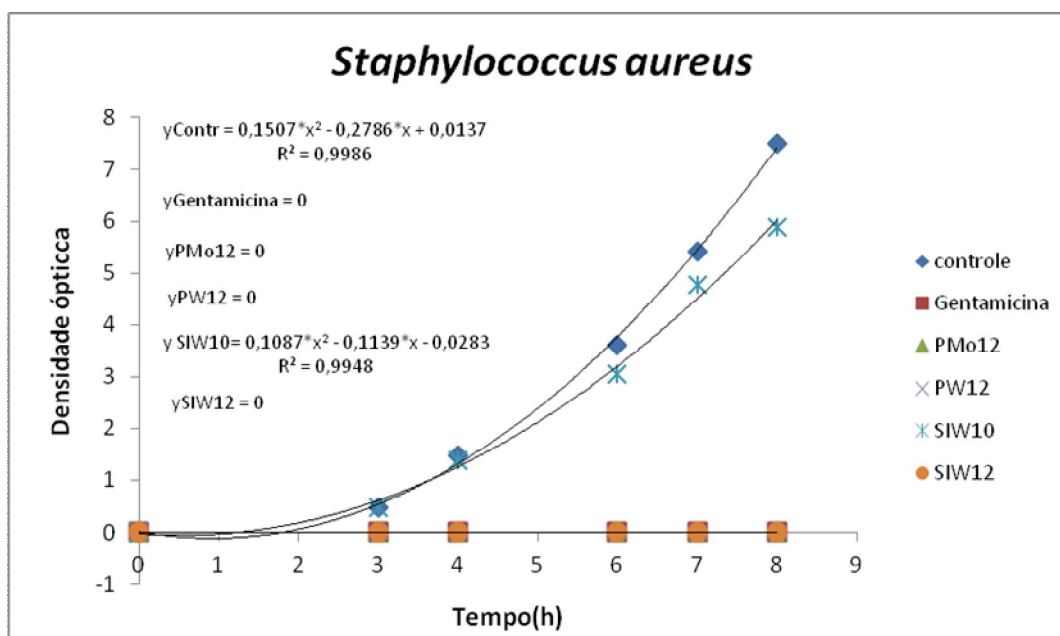


Figura 13: Curva de crescimento de *S. aureus* ATCC33591 na presença dos sais de HPAs $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$, $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$, $Ag_4[SiW_{10}V_2O_{40}]$ e $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 0h.

Os dados da tabela 6 mostram que $Ag_4[SiW_{10}V_2O_{40}]$ apresentou menor inibição comparado aos demais tratamentos, e foi estatisticamente diferente do grupo controle. Os tratamentos com $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$, $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$ e $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$ não diferiram estatisticamente do tratamento com gentamicina.

Tabela 6. Crescimento em meio líquido de *S. aureus* ATCC33591 na presença de gentamicina, $Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$, $Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$, $Ag_3[PW_{12}O_{40}]$ e $Ag_4[SiW_{10}V_2O_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 0h.

Tratamentos	Médias	Comparações
Controle	3.0833	A
$Ag_4[SiW_{10}V_2O_{40}]$	2.5917	B
Gentamicina	.0000	C
$Ag_3[PMo_{12}O_{40}]$.0000	C
$Ag_3[PW_{12}O_{40}]$.0000	C
$Ag_4[SiW_{12}O_{40}]$.0000	C

As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (5%).

6.4.3. Ensaio de inibição em meio líquido de *S. pseudintermedius* (SP2), na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 0h

Assim como com *S. aureus*, observou-se que $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ exibiram efeito de 100% de inibição sobre o crescimento de *S. pseudintermedius*, equivalendo-se ao controle positivo com Gentamicina. Já o HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor efeito de inibição, 25%, sobre o crescimento da bactéria. Os resultados estão apresentados na figura 14.

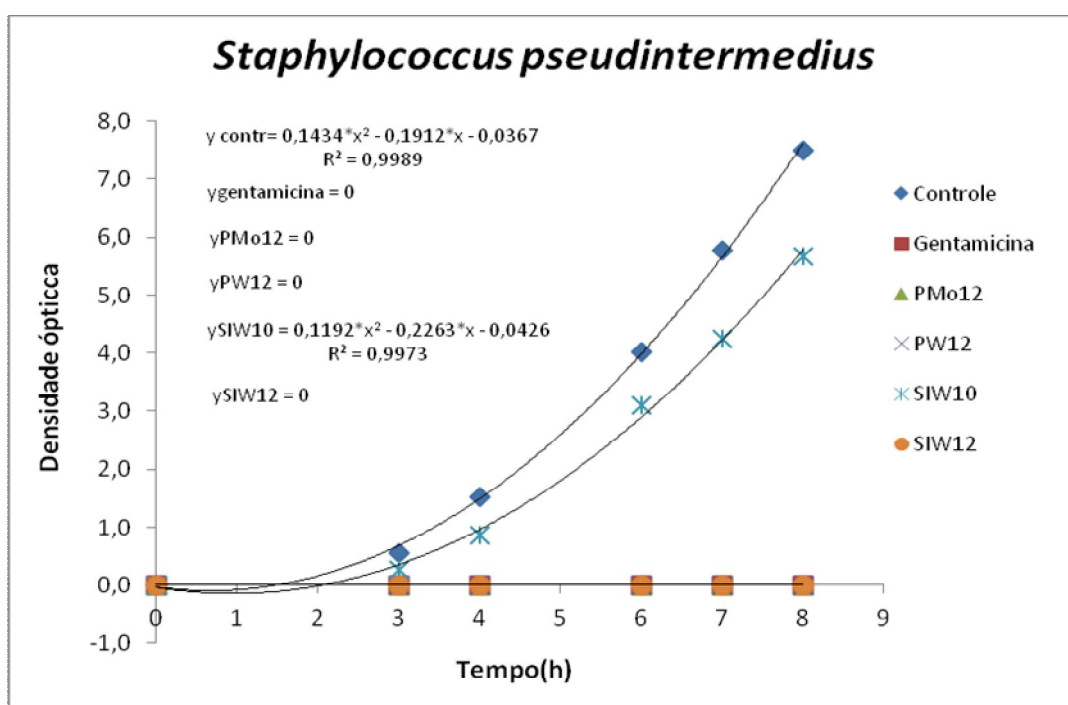


Figura 14: Curva de crescimento de *S. pseudintermedius* (SP2) na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 0h.

Os dados da tabela 7 mostram que $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor inibição comparado aos demais tratamentos, e foi estatisticamente diferente do

grupo controle. Os tratamentos com $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ não diferiram estatisticamente do tratamento com gentamicina.

Tabela 7. Crescimento em meio líquido de *S. pseudintermedius* (SP2) na presença de gentamicina, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 0h.

Tratamentos	Médias	Comparações
Controle	3.2306	A
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$	2.3417	B
Gentamicina	.0000	C
$\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$.0000	C
$\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$.0000	C
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$.0000	C

As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (5%).

6.4.4. Ensaio de inibição em meio líquido de *P. aeruginosa* ATCC9027, na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 0h

Os HPAs $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ exibiram efeito de 99% de inibição sobre o crescimento de *P. aeruginosa*, enquanto $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ inibiu 98%. Já o HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor efeito de inibição, 35%. Apenas o controle positivo com gentamicina inibiu 100% o crescimento da bactéria. Os resultados estão apresentados na figura 15.

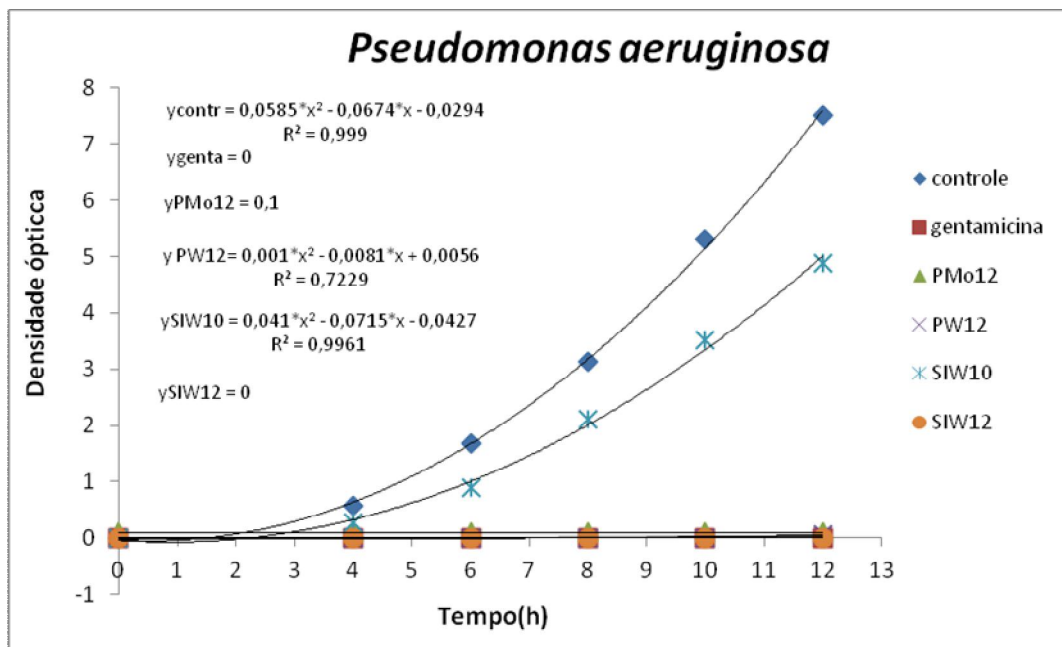


Figura 15: Curva de crescimento de *P. aeruginosa* ATCC9027 na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 0h.

Os dados da tabela 8 mostram que $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor inibição comparado aos demais tratamentos, e foi estatisticamente diferente do grupo controle. Estatisticamente o tratamento com $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ apresentou resultado inferior aos demais. Já $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ não diferiram do tratamento com gentamicina.

Tabela 8. Crescimento em meio líquido de *P. aeruginosa* ATCC9027 na presença de gentamicina, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 0h.

Tratamentos	Médias	Comparações
Controle	3.0333	A
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$	1.9417	B
$\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$.1000	C
$\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$.0111	D
Gentamicina	.0000	D
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$.0000	D

As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (5%).

6.5. Ensaio de inibição em meio líquido em fase exponencial de crescimento

6.5.1. Ensaio de inibição em meio líquido de *M. pachydermatis* (MP1) na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 36h

Observou-se que com adição dos HPAs no tempo de 36h, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, exibiu efeito de 92% de inibição sobre o crescimento da levedura, equivalendo-se ao controle positivo com miconazol. Os HPAs $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ apresentaram 58% e 82% de inibição, respectivamente. Já o HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor efeito de inibição, 33%, sobre o crescimento da levedura. Os resultados estão apresentados na figura 16.

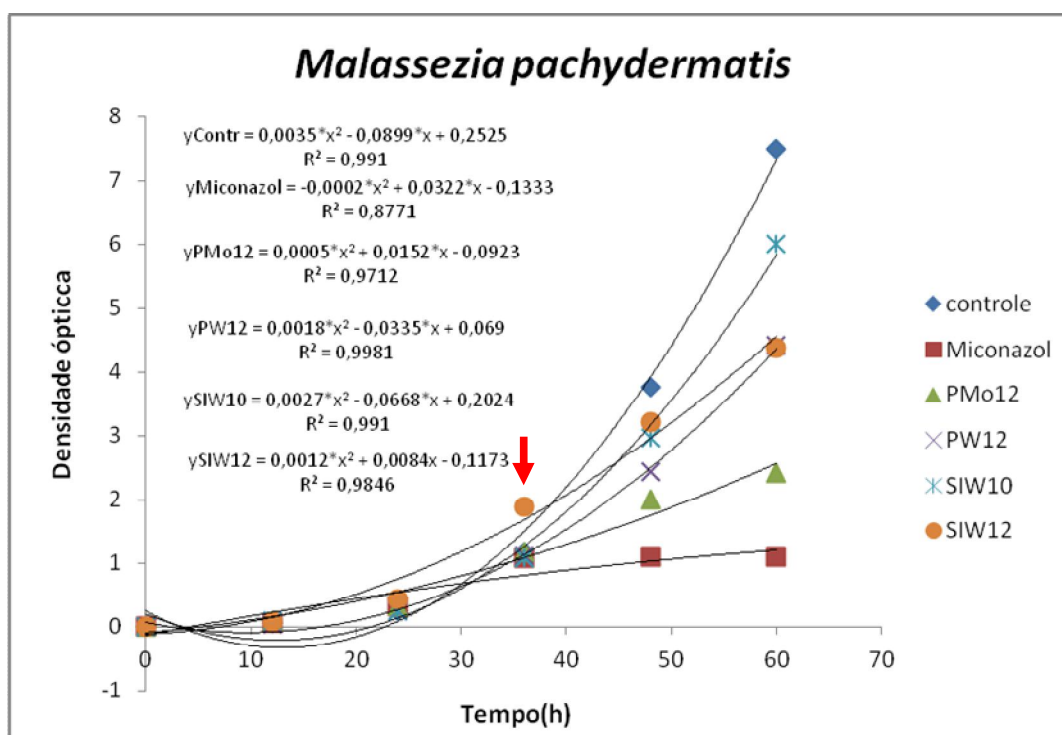


Figura 16: Curva de crescimento de *M. pachydermatis* (MP1) na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 36h.

Os dados da tabela 9 mostram que todos os tratamentos diferiram estatisticamente, sendo o tratamento com miconazol o mais efetivo, seguido por $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$.

Tabela 9. Crescimento em meio líquido de *M. pachydermatis* (MP1) na presença de miconazol, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 36h.

Tratamentos	Médias	Comparações
Controle	2.1278	A
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$	1.7333	B
$\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$	1.3778	C
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$	1.3028	D
$\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$	1.0056	E
Miconazol	.6139	F

As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (5%).

6.5.2. Ensaio de inibição em meio líquido de *S. aureus* ATCC33591, na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 3h

Observou-se que com adição dos HPA's no tempo de 3h, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ exibiram efeito de 96%, 95% e 92%, respectivamente, superando o efeito inibitório da gentamicina, que foi de 81%. Já o HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor efeito de inibição, 30%, sobre o crescimento da bactéria. Os resultados estão apresentados na figura 17.

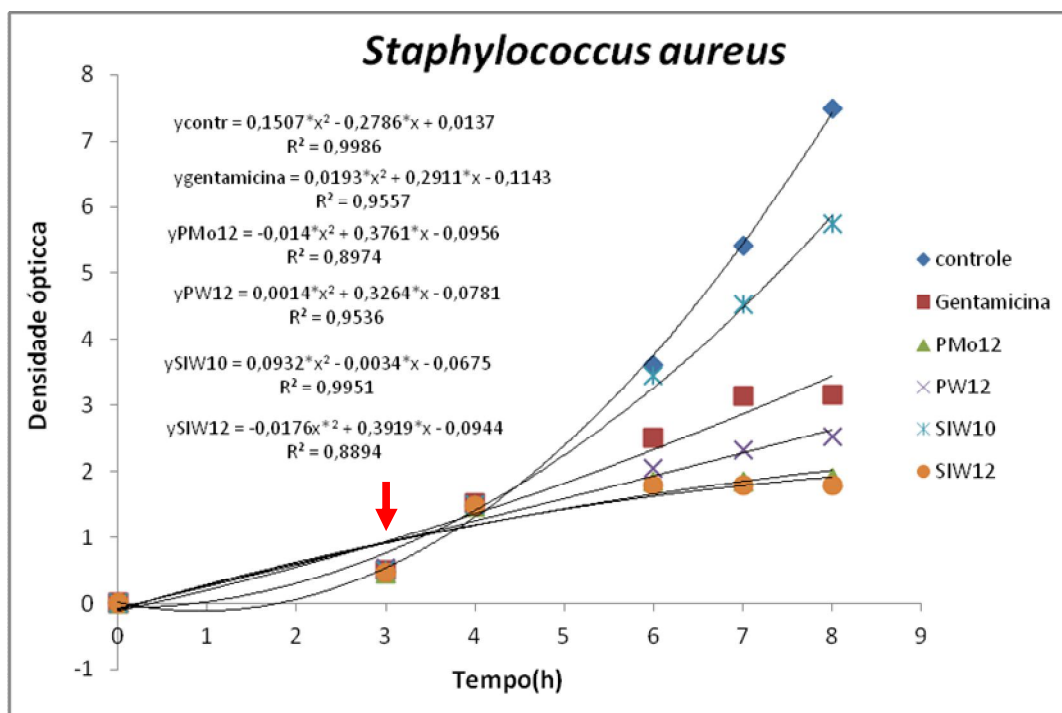


Figura 17: Curva de crescimento de *S. aureus* ATCC33591 na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 3h.

Os dados da tabela 10 mostram que $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor inibição comparado aos demais tratamentos, e foi estatisticamente diferente do grupo controle. Os tratamentos com $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ não diferiram entre si e apresentaram o melhor resultado, seguido de $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$,

tendo esses 3 HPAs apresentado resultado melhor que o tratamento com gentamicina.

Tabela 10. Crescimento em meio líquido de *S. aureus* ATCC33591 na presença de gentamicina, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 3h.

Tratamentos	Médias	Comparações
Controle	3.0833	A
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$	2.6194	B
Gentamicina	1.8028	C
$\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$	1.4861	D
$\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$	1.2528	E
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$	1.2250	E

As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (5%).

6.5.3. Ensaio de inibição em meio líquido de *S. pseudintermedius* (SP2), na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 4h

Observou-se que com adição dos HPAs no tempo de 4h, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ apresentou 97% de inibição sobre o crescimento da bactéria, seguido por gentamicina, 95%, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, 94%, e $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, 93%. Da mesma forma como em *M. pachydermatis* e *S. aureus*, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor efeito de inibição, 24%. Os resultados estão apresentados na figura 18.

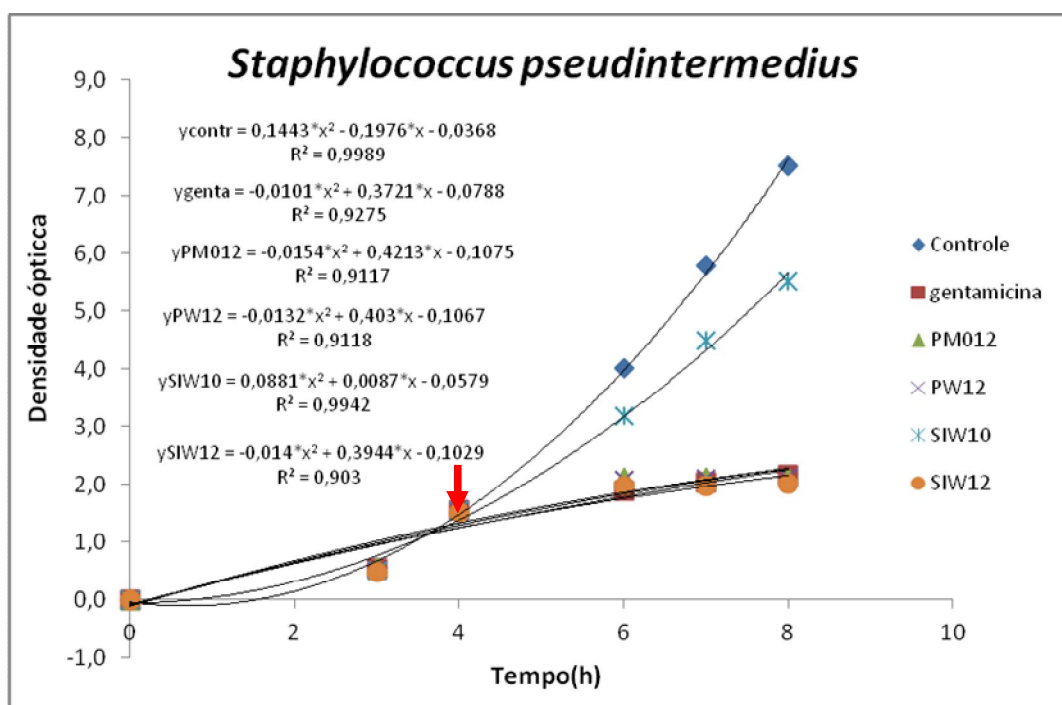


Figura 18: Curva de crescimento de *S. pseudintermedius* (SP2) na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 4h.

Os dados da tabela 11 mostram que $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor inibição comparado aos demais tratamentos, e foi estatisticamente diferente do grupo controle. O tratamento com $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ não diferiu ao tratamento com $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, que por sua vez não diferiu ao tratamento com gentamicina, que não diferiu ao tratamento com $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$.

Tabela 11. Crescimento em meio líquido de *S. pseudintermedius* (SP2) na presença de gentamicina, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 4h

Tratamentos	Médias	Comparações
Controle	3.2250	A
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$	2.5389	B
$\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$	1.4111	C
$\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$	1.3917	C D
Gentamicina	1.3639	D E
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$	1.3306	E

As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (5%).

6.5.4. Ensaio de inibição em meio líquido de *P. aeruginosa* ATCC9027, na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 6h

Observou-se que com adição dos HPAs no tempo de 6h, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ exibiram efeito de 96% de inibição. Gentamicina inibiu 98% do crescimento da bactéria. E o HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor efeito de inibição, 33%. Os resultados estão apresentados na figura 19.

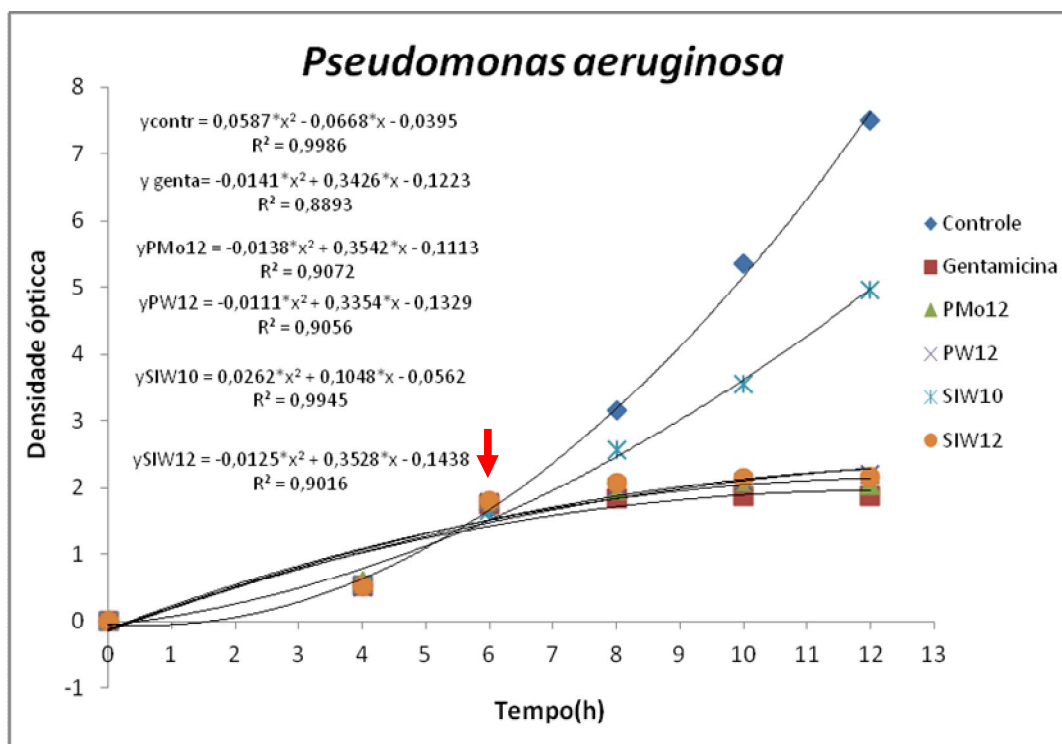


Figura 19: Curva de crescimento de *P. aeruginosa* ATCC9027 na presença dos sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 6h.

Os dados da tabela 12 mostram que $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ apresentou menor inibição comparado aos demais tratamentos, e foi estatisticamente diferente do grupo controle. Os tratamentos com $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ não diferiram entre si. E gentamicina apresentou o melhor resultado de inibição, diferindo dos demais tratamentos.

Tabela 12. Crescimento em meio líquido de *P. aeruginosa* ATCC9027 na presença de gentamicina, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$, na concentração $0,028\mu\text{mol/mL}$, adicionados no tempo 6h.

Tratamentos	Médias	Comparações
Controle	3.0333	A
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$	2.2167	B
$\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$	1.4556	C
$\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$	1.4361	C
$\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$	1.4191	C
Gentamicina	1.3167	D

As médias seguidas das mesmas letras não diferem entre si significativamente pelo teste de Tukey (5%).

A prata vem sendo utilizada ao longo da história por suas propriedades antimicrobianas, comprovada pelo advento da sulfadiazina de prata, em 1965 (FOX, 1968) e que ainda hoje é utilizada no mundo todo. Os HPAs tiveram em sua composição o nitrato de prata, característica que talvez explique a sua atividade antimicrobiana. Wright et al., (2012) testaram uma nova série de três complexos de carbeno de prata sobre estirpes clínicas de *S. aureus* (MRSA) e *P. aeruginosa*. Estes complexos mostraram-se altamente eficazes, com concentrações mínimas inibitórias (CMI) de 0,25 a 6 mg/mL. Chen et al., (2011) testaram a atividade antimicrobiana de nanopartículas de prata, incorporadas em gel termossensível, sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*, onde demonstrou-se atividade promissora contra *S. aureus* e atividade moderada contra *P. aeruginosa*. Na análise por MET observou-se que tais compostos podem destruir a estrutura das membranas celulares das bactérias.

O mecanismo exato que as nanopartículas de prata empregam para provocar um efeito antimicrobiano não é claramente conhecido e é um tópico debatido (PRABHU; POULOSE, 2012). Essas nanopartículas de prata têm a capacidade de ancorar a parede celular bacteriana e, subsequentemente, penetrar, causando assim mudanças estruturais na membrana da célula, como na permeabilidade da membrana celular e a morte da célula (SONDI; SALOPEK-SONDI, 2004). Também foi proposto que pode haver libertação de íons de prata por nanopartículas (FENG et al., 2008), e esses íons podem

interagir com os grupos tiol de muitas enzimas vitais e inativá-los (MATSUMURA et al., 2003).

Silva (2007) também testou a atividade biológica de HPAs sobre a levedura *M. pachydermatis*, em meio sólido e líquido, com o composto $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, na concentração $15,7\mu\text{M}/\text{mL}$, portanto 28 vezes superior à utilizada neste trabalho, e também observou efeito inibitório deste HPA. Bau (2007) também testou o heteropoliácido $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, na concentração $15,7\mu\text{M}/\text{mL}$, sobre *C. albicans*, *C. glabrata* e *C. tropicalis* e obteve efeito inibitório significativo sobre o seu crescimento. Mathias (2010) testou os mesmos HPAs utilizados neste trabalho sobre o fungo *Sporothrix schenckii*, onde apenas o $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ não apresentou efeito significativo nos testes de susceptibilidade sobre as células fúngicas.

Cepas multirresistentes de *S. aureus* foram testadas em meio líquido frente ao HPA $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, sendo este composto capaz de reduzir as UFCs após 5 horas de incubação (DIAS et al., 2004 a,b). Feng e colaboradores (2010) demonstraram a atividade inibitória de um heteropoliácido com composição diferente dos utilizados nesse trabalho, sendo esse HPA capaz de inibir 99,33% do crescimento de *S. aureus*. No trabalho de Gossani e colaboradores (2010), os sais de HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ na concentração $0,28\mu\text{M}/\text{mL}$, também foram capazes de inibir o crescimento de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Da mesma forma como neste trabalho, $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ foi o único HPA que apresentou inibição inferior aos demais tratamentos, em todas as cepas tratadas. Ainda não há na literatura relatos da atividade antimicrobiana de HPAs sobre *S. pseudintermedius*.

É digno de nota o fato de que os HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ apresentaram uma maior taxa de inibição do crescimento sobre MRSA, em comparação com gentamicina e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ apresentou resultado compatível com a gentamicina contra MRPS cepa clínica, denotando seu potencial de atividade antimicrobiana .

6.6. Permeabilização das Membranas

6.6.1. *Malassezia pachydermatis* (MP1)

Observou-se que nas células sem tratamento, o corante vital SYTOX® Green não foi capaz de penetrar a membrana da levedura. Já após os tratamentos com as substâncias que apresentaram atividade antimicrobiana, o corante foi capaz de permear a membrana dessas células, indicando que de alguma forma essa membrana estava danificada (Figura 20).

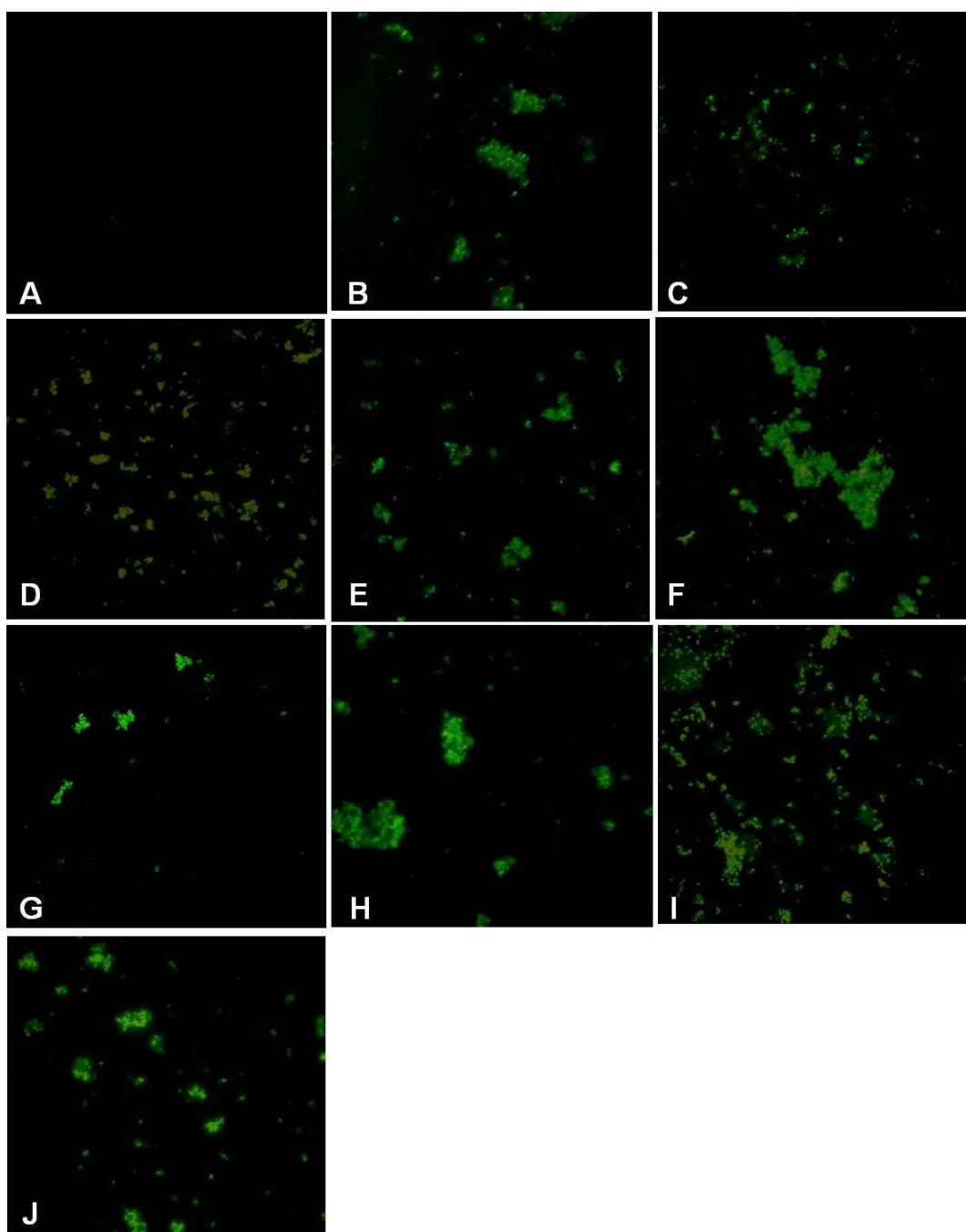


Figura 20: Microscopia óptica de fluorescência (MOF) de *M. pachydermatis* (MP1): (A) Controle (sem tratamento); (B) Tratada com miconazol [0,05mg/mL]; (C) Tratada com Capsaicina [0,05mg/mL]; (D) Tratada com extrato de *H. sabdariffa* [3,15mg/mL]; (E) Tratada com $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ [0,028 $\mu\text{mol/mL}$]; (F) Tratada com $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ [0,028 $\mu\text{mol/mL}$]; (G) Tratada com $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ [0,028 $\mu\text{mol/mL}$]; (H) Tratada com extrato de *C. baccatum* IIP2 [20mg/mL]; (I) Tratada com extrato de *C. baccatum* IIF1 [20mg/mL]; (J) Tratada com extrato de *C. baccatum* IIIP1 [20mg/mL].

6.6.2. *Staphylococcus aureus* ATCC33591

Da mesma forma como em *M. pachydermatis*, o corante vital SYTOX® Green não foi capaz de penetrar a membrana de *S. aureus* sem tratamento. Já após os tratamentos, este foi capaz de permear a membrana das células (Figura 21).

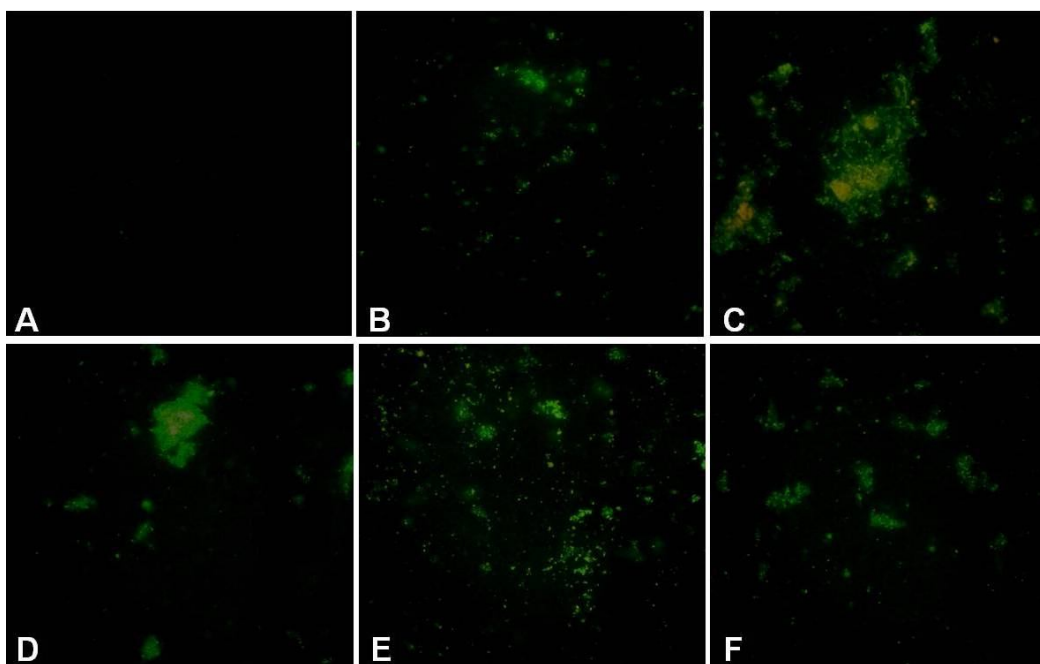


Figura 21: Microscopia óptica de fluorescência (MOF) de *S. aureus* ATCC33591: (A) Controle (sem tratamento); (B) Tratada com gentamicina [10µg/mL]; (C) Tratada com extrato de *H. sabdariffa* [5,3mg/mL]; (D) Tratada com Ag₃[PMo₁₂O₄₀] [0,028µmol/mL]; (E) Tratada com Ag₃[PW₁₂O₄₀] [0,028µmol/mL]; (F) Tratada com Ag₄[SiW₁₂O₄₀] [0,028µmol/mL].

6.6.3. *Staphylococcus pseudintermedius* (SP2)

Assim como em *M. pachydermatis* e *S. aureus*, o corante não penetrou a membrana de *S. pseudintermedius* sem tratamento. Porém, após os tratamentos, este foi capaz de permear a membrana das células, indicando dano dessa membrana (Figura 22).

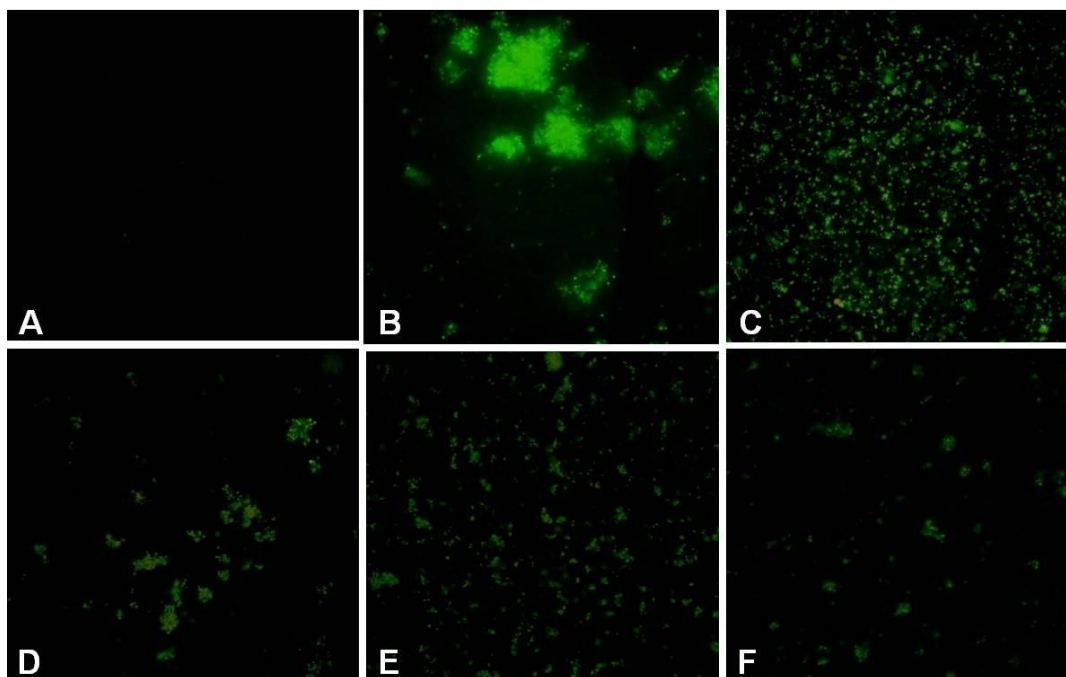


Figura 22: Microscopia óptica de fluorescência (MOF) de *S. pseudintermedius* (SP2): (A) Controle (sem tratamento); (B) Tratada com gentamicina [10 μ g/mL]; (C) Tratada com extrato de *H. sabdariffa* [5,3mg/mL]; (D) Tratada com Ag₃[PMo₁₂O₄₀] [0,028 μ mol/mL]; (E) Tratada com Ag₃[PW₁₂O₄₀] [0,028 μ mol/mL]; (F) Tratada com Ag₄[SiW₁₂O₄₀] [0,028 μ mol/mL].

6.6.4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027

Assim como em *M. pachydermatis*, *S. aureus* e *S. pseudintermedius*, o corante não foi capaz de penetrar a membrana de *P. aeruginosa* não tratada. Porém, após os tratamentos, o SYTOX Green foi capaz de permear a membrana dessas células (Figura 23).

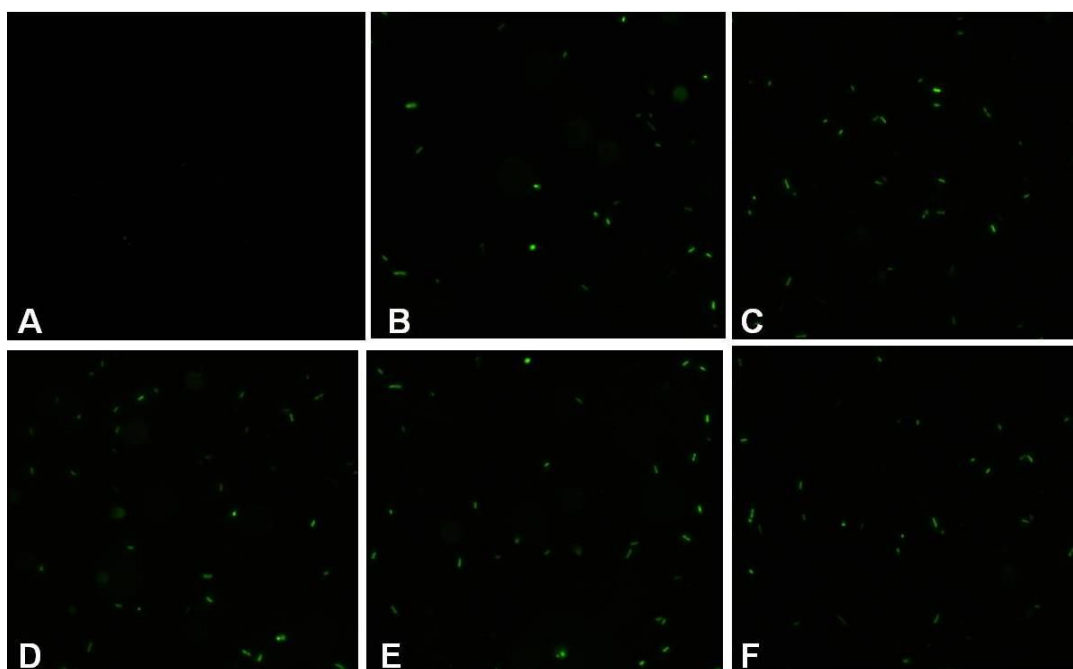


Figura 23: Microscopia óptica de fluorescência (MOF) de *P. aeruginosa* ATCC9027: (A) Controle (sem tratamento); (B) Tratada com gentamicina [10µg/mL]; (C) Tratada com extrato de *H. sabbaii* [5,3mg/mL]; (D) Tratada com Ag₃[PMo₁₂O₄₀] [0,028µmol/mL]; (E) Tratada com Ag₃[PW₁₂O₄₀] [0,028µmol/mL]; (F) Tratada com Ag₄[SiW₁₂O₄₀] [0,028µmol/mL].

O crescimento bacteriano e o metabolismo podem ser interrompidos por uma variedade de tratamentos físicos, bem como por processos químicos e agentes biológicos. O efeito de tais tratamentos sobre as bactérias tem sido avaliado por uma série de técnicas diferentes (FAVERO et al., 1991; LLOYD; HAYES, 1995; THORNSBERRY, 1991). Viabilidade em bactérias é frequentemente relacionada com a capacidade de formar colônias em meio de crescimento sólido ou para proliferar em soluções que contenham nutrientes. Por esses critérios, a atividade antimicrobiana é definida como a capacidade para limitar o crescimento dos micro-organismos. Ensaio que avaliam a viabilidade bacteriana, embora simples, podem ser demorados, dispendiosos e insensíveis, particularmente para a avaliação de organismos de crescimento lento (ROTH et al, 1997).

Ensaio baseado em fluorescência para avaliar a viabilidade bacteriana foram introduzidos na década de 90. Quando a membrana plasmática ou parede celular é comprometida, os compostos que normalmente não conseguem penetrar no citoplasma por causa do tamanho ou carga, por exemplo, o SYTOX® Green, entram livremente nas células. Dessa forma, os

micro-organismos permeabilizados são corados com uma intensa fluorescência verde, indicando comprometimento da integridade dessas células (JEPRAS et al., 1995).

Roth e colaboradores (1997) testaram suspensões de *E. coli* e *S. aureus* tratadas com antibióticos β -lactâmicos (ampicilina, amoxicilina, penicilina e vancomicina) por microscopia de fluorescência com SYTOX® Green. Estes autores concluíram que os antimicrobianos foram capazes de alterar a membrana dessas bactérias, deixando as células tratadas 10x mais fluorescentes que as não tratadas. No trabalho de Diz e colaboradores (2006), a fração F1 do extrato de *C. annuum*, já citada anteriormente por inibir o crescimento de *C. albicans* e *S. cerevisiae*, também foi testada para investigar sua capacidade de permeabilizar a membrana plasmática de *S. cerevisiae*. Após 30min. de incubação com SYTOX® Green e observadas por microscopia de fluorescência, as células de *S. cerevisiae* mostraram-se fortemente fluorescentes.

Os resultados desse trabalho com os extratos e HPAs confirmam a ruptura da levedura e das bactérias tratadas, e, por conseguinte, as células fluorescentes foram claramente visíveis quando comparadas com os controles negativos (sem tratamento).

6.7. Análise por Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

6.7.1. *Malassezia pachydermatis* (MP1)

Na amostra não tratada (controle) podem ser observadas as estruturas superficiais da levedura, como parede celular espessa, arranjos dentados da camada interna da parede celular, membrana plasmática espiralada, vacúolos com granulos eletrodensos, septo de divisão celular e colar na célula mãe. Em todos os tratamentos observou-se grande parte dos micro-organismos apresentando rompimento da parede celular com extravasamento do seu citoplasma (Figura 24).

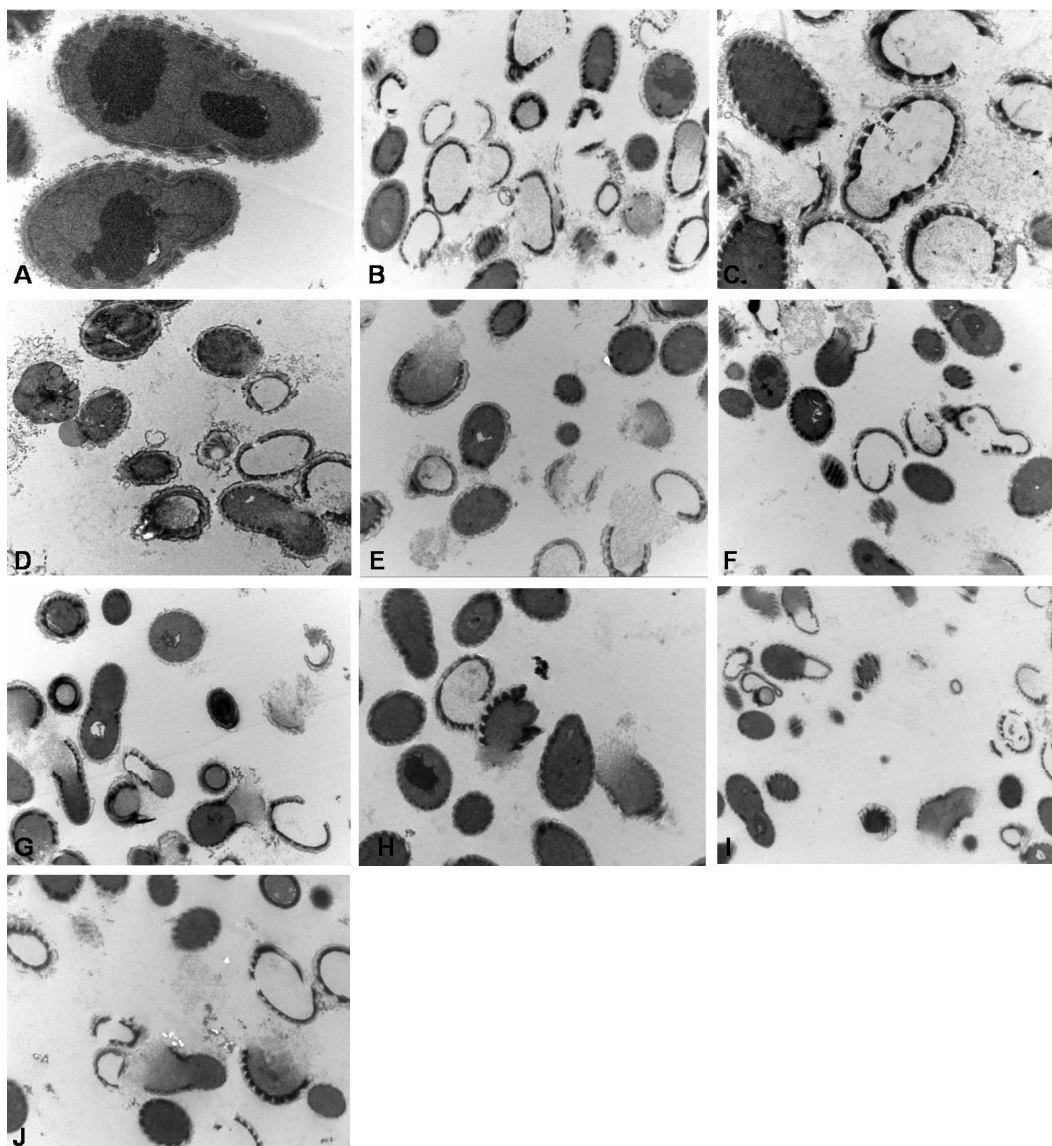


Figura 24: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *M. pachydermatis* (MP1): (A) Controle (sem tratamento); (B) Tratada com miconazol [0,05mg/mL]; (C) Tratada com capsaicina [0,05mg/mL]; (D) Tratada com extrato de *H. sabdariffa* [3,15mg/mL]; (E) Tratada com extrato de *C. baccatum* IIP2 [20mg/mL]; (F) Tratada com extrato de *C. baccatum* IIF1 [20mg/mL]; (G) Tratada com extrato de *C. baccatum* IIIP1 [20mg/mL]; (H) Tratada com $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ [0,028 $\mu\text{mol/mL}$]; (I) Tratada com $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ [0,028 $\mu\text{mol/mL}$]; (J) Tratada com $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ [0,028 $\mu\text{mol/mL}$].

No trabalho realizado por MATHIAS (2010), com os mesmos HPAs utilizados neste trabalho frente às células leveduriformes de *S. schenckii*, as mesmas apresentaram alterações significativas na sua ultra-estrutura após os tratamentos: desestruturação da parede celular, desorganização da membrana com formação de uma estrutura que lembra uma figura de mielina, além da formação de grandes vacúolos. SILVA (2007), utilizou o HPA $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ na

concentração $15,7\mu\text{M}/\text{mL}$ e observou espessamento da parede celular, desestruturação das organelas, além de perda de eletrodensidade.

Vieira-da-Motta e colaboradores (2008) testaram a atividade de metabólitos secundários de *Burkholderia* sp. sobre *M. pachydermatis*. Na análise por MET, estes autores observaram alterações da parede com diminuição da eletrodensidade e desestruturação das organelas, sugerindo a atividade interna e externa dos metabólitos sobre a levedura.

6.7.2. *Staphylococcus aureus* ATCC33591

No controle observou-se as células com estruturas normais, apresentando parede celular e membrana plasmática intactas, além de divisão celular característica. No tratamento com Gentamicina observou-se alteração na parede celular e formação de vacúolos no citoplasma. No tratamento com extrato de *H. sabdariffa* observaram-se restos citoplasmáticos, além de perda da parede celular. Nos tratamentos com os HPAs observou-se a presença de células totalmente alteradas, com divisão celular aberrante e comprometimento da parede celular e membrana plasmática (Figura 25).

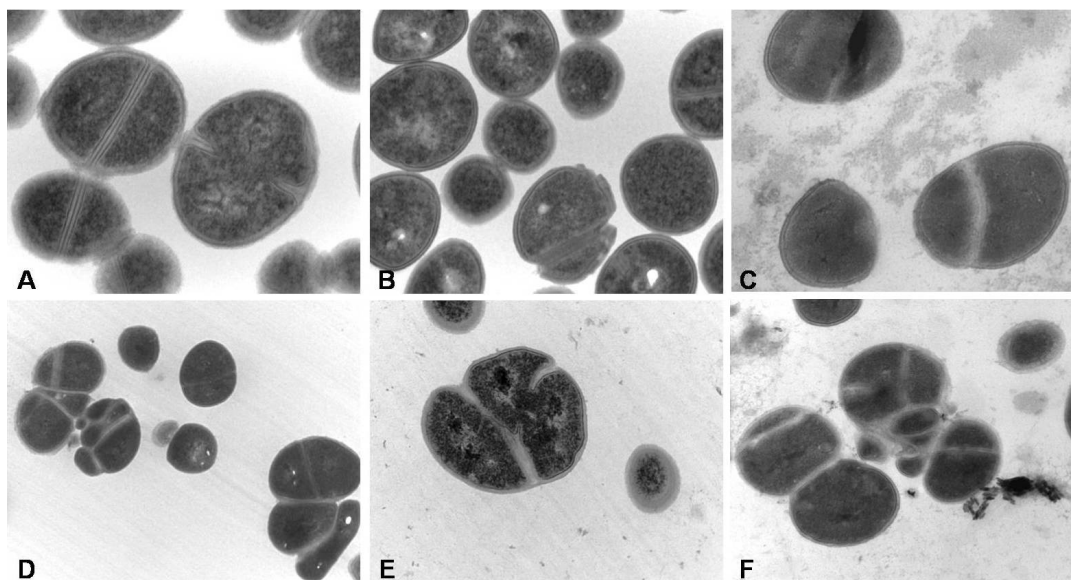


Figura 25: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *S. aureus* ATCC33591: (A) Controle (sem tratamento); (B) Tratada com gentamicina [$10\mu\text{g}/\text{mL}$]; (C) Tratada com extrato de *H. sabdariffa* [$5,3\text{mg}/\text{mL}$]; (D) Tratada com $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ [$0,028\mu\text{mol}/\text{mL}$]; (E) Tratada com $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ [$0,028\mu\text{mol}/\text{mL}$]; (F) Tratada com $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ [$0,028\mu\text{mol}/\text{mL}$].

No trabalho de Micas (2008) testou-se a atividade antimicrobiana de violaceína, um composto indol de intensa cor violeta que é produzido por *Chromobacterium violaceum*, uma bactéria ubíqua de zonas tropicais e subtropicais. Na análise por MET, foram observadas alterações significativas na parede celular de *S. aureus* com alterações abrangendo desde leves desestruturações da parede até sua completa destruição. Nesse trabalho o autor também faz comparações com as alterações encontradas em células de *Staphylococcus* tratadas com penicilina como, por exemplo, o extravasamento de material citoplasmático.

Bouhdid e colaboradores (2009) testaram a atividade do óleo essencial de *Origanum compactum* sobre *P. aeruginosa* e *S. aureus*. O dano induzido por esse composto foi estudado utilizando-se diferentes técnicas, sendo uma delas a microscopia eletrônica de transmissão. *S. aureus* apresentou um acúmulo de estruturas membranosas no citoplasma das células tratadas com o óleo, enquanto que nenhuma alteração ultra-estrutural foi observada nas células não tratadas. Da mesma forma como ocorrido no presente trabalho, apesar das grandes alterações nas células tratadas, estas não se encontravam lisadas.

Rebets e colaboradores (2013) utilizaram moenomicina, um antibiótico proposto por atingir a glicosiltransferase dos peptidoglicanos (PGTs). As células resistentes a esse composto apresentaram mutação no sítio ativo da PGT, produzindo cadeias mais curtas de peptidoglicanos. A principal alteração observada por MET ocorreu na divisão celular dos micro-organismos, que se apresentou de forma aberrante, da mesma forma como ocorrido neste trabalho. Assim sendo, sugere-se que os sais de HPAs também alteraram as PGTs em *S. aureus*, de acordo com as imagens de MET.

6.7.3. *Staphylococcus pseudintermedius* (SP2)

Na amostra não tratada (controle) observaram-se as células com estruturas normais, assim como em *S. aureus*, apresentando parede celular e membrana plasmática intactas, além de divisão celular característica. Em todos os tratamentos observou-se a presença de células com grandes alterações, como divisão celular aberrante, perda de parede celular e desorganização do citoplasma (Figura 26).

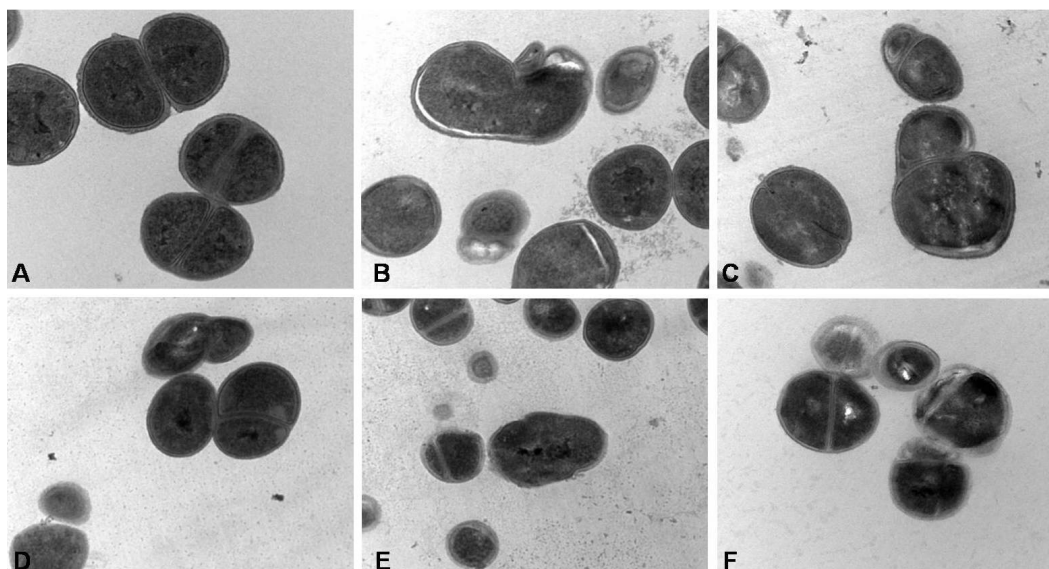


Figura 26: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *S. pseudintermedius* (SP2): (A) Controle (sem tratamento); (B) Tratada com gentamicina [10 μ g/mL]; (C) Tratada com extrato de *H. sabdariffa* [5,3mg/mL]; (D) Tratada com Ag₃[PMo₁₂O₄₀] [0,028 μ mol/mL]; (E) Tratada com Ag₃[PW₁₂O₄₀] [0,028 μ mol/mL]; (F) Tratada com Ag₄[SiW₁₂O₄₀] [0,028 μ mol/mL].

Não há relatos na literatura da análise por MET em *S. pseudintermedius*, mas como citado anteriormente, outros autores já analisaram a ultra-estrutura de bactérias do gênero *Staphylococcus* sp.

6.7.4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027

Na amostra não tratada (controle) podem ser observadas as estruturas da bactéria sem alteração. No tratamento com gentamicina observou-se a presença de vesículas e deposição de estruturas que se assemelham a cristas na superfície da parede celular, além de alteração na distribuição de DNA no citoplasma através da condensação de cromatina. No tratamento com o extrato de *H. sabdariffa* houve alteração na parede celular, citoplasma com aspecto diluído e a presença de células rompidas. Nos tratamentos com os HPA's, observaram-se as células rompidas e extravasamento do conteúdo citoplasmático (Figura 27).

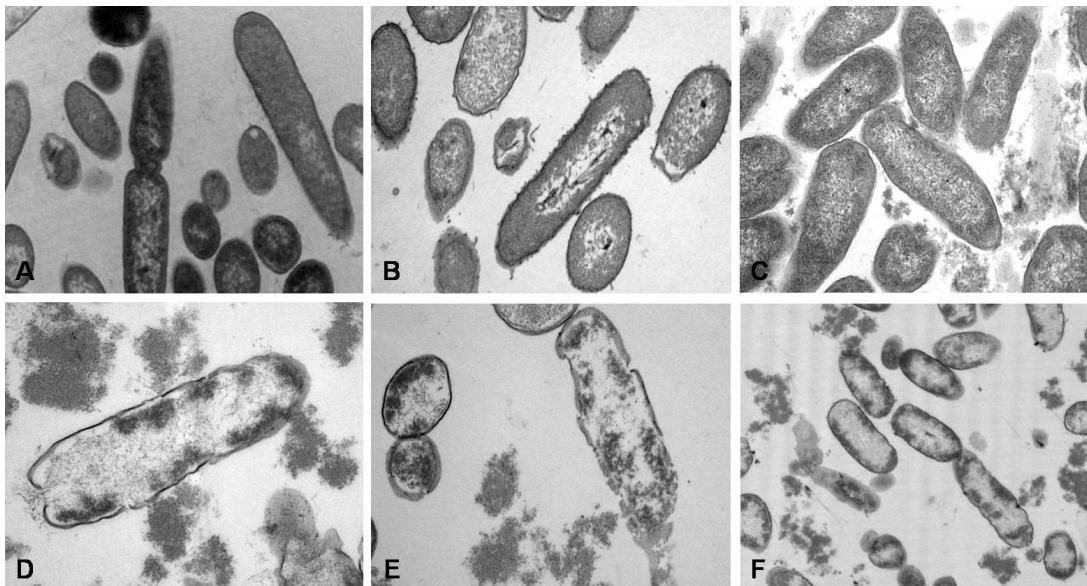


Figura 27: Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de *P. aeruginosa* ATCC9027: (A) Controle (sem tratamento); (B) Tratada com gentamicina [10µg/mL]; (C) Tratada com extrato de *H. sabdariffa* [5,3mg/mL]; (D) Tratada com $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ [0,028µmol/mL]; (E) Tratada com $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ [0,028µmol/mL]; (F) Tratada com $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ [0,028µmol/mL].

Yi e colaboradores (2010) delineararam o mecanismo de inibição de polifenóis do chá sobre *P. aeruginosa*. As alterações morfológicas na bactéria tratada foram investigadas por microscopia eletrônica de transmissão, com resultados que indicam que a ação inibitória primária dos polifenóis do chá é danificar a membrana das células bacterianas, rompendo-as. Os polifenóis também aumentaram a permeabilidade das membranas exteriores e interiores de *P. aeruginosa*.

Hyo e colaboradores (2012) testaram a solução de Burow®, acetato de alumínio dissolvido em água, e comprovaram sua eficácia sobre a otite média crônica supurativa e otite externa. Esses autores demonstraram que a solução de Burow® teve efeito antibacteriano sobre *S. aureus* e *P. aeruginosa*, induzindo alterações ultra-estruturais nestas bactérias *in vitro*. Observações em MET revelaram deformações na parede celular bacteriana e citoplasma com rarefação do material citoplasmático em ambas as bactérias.

O ozônio tem sido cada vez mais utilizado como um desinfetante alternativo ao cloro para tratamento da água, devido à sua potente ação oxidante e propriedades antimicrobianas. Estudos têm sido realizados para elucidar a cinética de inativação de *P. aeruginosa* pelo ozônio. No trabalho de

Zhang e colaboradores (2011) foi analisado o mecanismo de lesão induzido por ozônio na ultra-estrutura celular de *P. aeruginosa*. Suspensões celulares da bactéria foram tratadas com água ozonizada e observadas em MET, que revelaram que os efeitos do ozônio eram principalmente sobre a aglutinação do citoplasma e permeabilização da membrana citoplasmática (através do vazamento de compostos celulares), resultado parecido ao encontrado no presente trabalho, onde os tratamentos causaram rompimento da parede da bactéria e extravasando seu conteúdo citoplasmático.

6.8. Análise por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

6.6.1. *Malassezia pachydermatis* (MP1)

Na amostra não tratada (controle), pode-se observar a estrutura de biofilme formada sobre a lamínula de vidro. Observou-se a sobreposição de células leveduriformes organizadas em multicamadas, formando uma extensa comunidade microbiana. No tratamento com miconazol, foram vistos apenas restos celulares sobre a lamínula. Nos tratamentos com os compostos de *H. sabdariffa*, *C. baccatum*, *Capsaicina* e HPAs, a levedura não foi capaz de formar tal comunidade microbiana, como pode observar a presença de células aderidas, mas de maneira isolada (Figura 28).

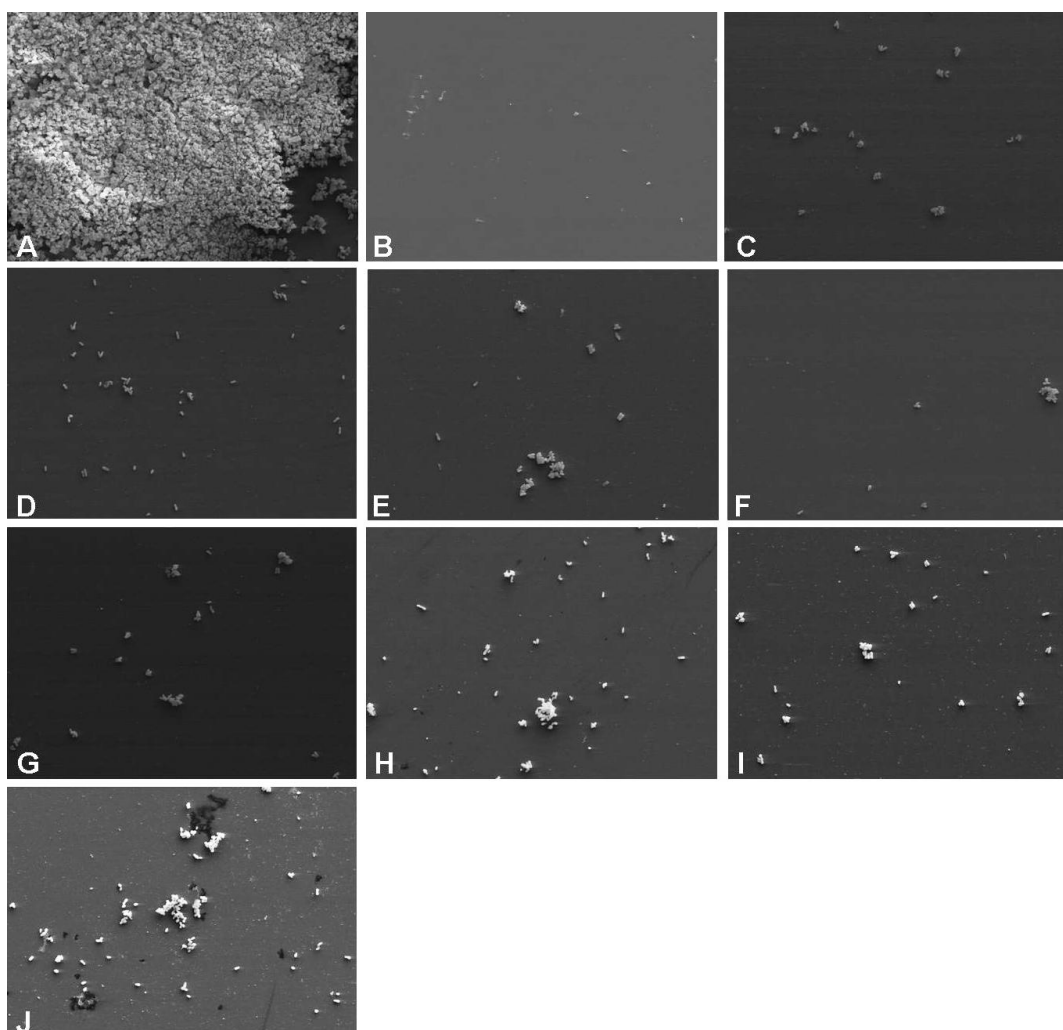


Figura 28: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *M. pachydermatis* (MP1): (A) Controle (sem tratamento); (B) Tratada com miconazol [0,05mg/mL]; (C) Tratada com capsaicina [0,05mg/mL] ; (D) Tratada com extrato de *H. sabdariffa* [3,15mg/mL] ; (E) Tratada com extrato de *C. baccatum* IIP2 [20mg/mL]; (F) Tratada com extrato de *C. baccatum* IIF1 [20mg/mL]; (G) Tratada com extrato de *C. baccatum* IIIP1 [20mg/mL]; (H) Tratada com $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$ [0,028 $\mu\text{mol/mL}$]; (I) Tratada com $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ [0,028 $\mu\text{mol/mL}$]; (J) Tratada com $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ [0,028 $\mu\text{mol/mL}$].

A capacidade *M. pachydermatis* formar biofilme foi primeiramente sugerida por Cannizzo e colaboradores (2007). Em 2012, Figueredo e colaboradores testaram 62 cepas de *M. pachydermatis* coletadas da pele de cães. Dessas 62, 59 (95,2%) foram capazes de formar biofilme, onde a análise por MEV revelou uma grande heterogeneidade na arquitetura dessas estruturas. A associação entre leveduras e sua capacidade de formar biofilme foi anteriormente sugerida para *C. albicans* (HAWSER; DOUGLAS, 1994) e *C. parapsilosis* (SILVA et al., 2009).

O estudo de Figueredo e colaboradores (2013) teve como objetivo avaliar a susceptibilidade antifúngica *in vitro* de cepas de *M. pachydermatis*, tanto em sua forma planctônica quanto sésil, a diferentes antifúngicos. Os valores da concentração inibitória mínima foram significativamente maiores para as células sésseis em relação a células planctônicas, sendo 90% das estirpes de *M. pachydermatis* na sua forma sésil classificadas como resistentes a todos os agentes antifúngicos testados.

6.7.2. *Staphylococcus aureus* ATCC33591

Na amostra não tratada (controle), observou-se a estrutura de biofilme de *S. aureus* formada sobre a lamínula de vidro. Nos tratamentos com gentamicina, extrato de *H. sabdariffa* e HPAs, a bactéria não foi mais capaz de formar o biofilme, como pode observar a presença de células aderidas, mas de maneira isolada (Figura 29).

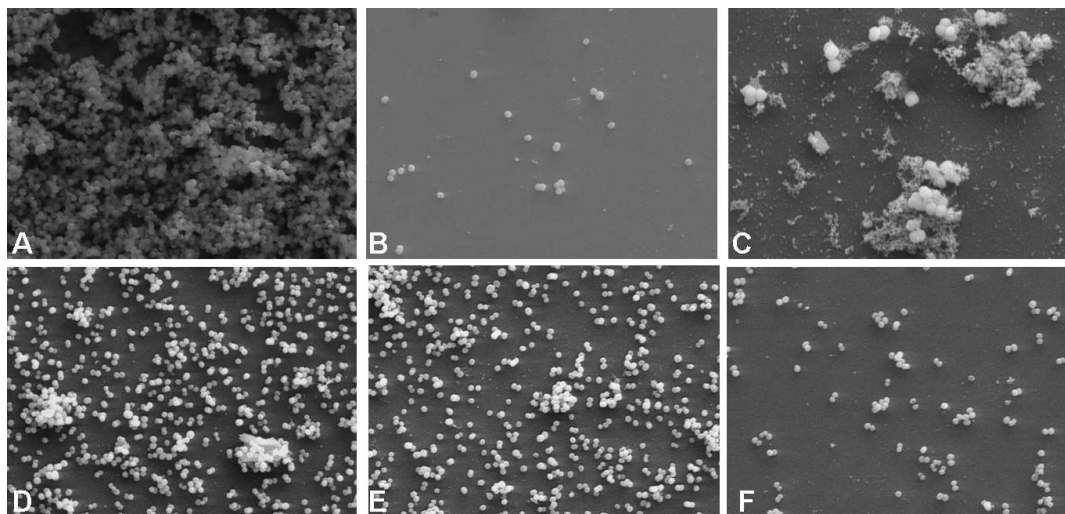


Figura 29: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *S. aureus* ATCC33591: (A) Controle (sem tratamento); (B) Tratada com gentamicina [10 μ g/mL]; (C) Tratada com extrato de *H. sabdariffa* [5,3mg/mL]; (D) Tratada com Ag₃[PMo₁₂O₄₀] [0,028 μ mol/mL]; (E) Tratada com Ag₃[PW₁₂O₄₀] [0,028 μ mol/mL]; (F) Tratada com Ag₄[SiW₁₂O₄₀] [0,028 μ mol/mL].

A capacidade de *Staphylococcus* sp. formar biofilmes tem sido associada à persistência de infecções crônicas, que tem atraído considerável interesse de pesquisadores na última década, onde estudos recentes relatam

alternativas para prevenir a formação e dispersar biofilmes já formados (KIEDROWSKI; HORSWILL, 2011). Yujie e colaboradores (2013) estudaram a atividade de furanonas bromadas, compostos isolados de organismos marinhos, sobre a formação de biofilme de *S. aureus* em biomaterial de PVC. Microscopia eletrônica de varredura foi utilizada para avaliar a espessura e estrutura do biofilme bacteriano, onde se observou que o tratamento com os compostos foi capaz de impedir a formação do biofilme. Budzynska e colaboradores (2011) examinaram a atividade antibiofilme de óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia* e *Melissa officinales* sobre *S. aureus* e *E. coli* em superfícies de materiais utilizados em hospitais, e constataram alta atividade desses compostos sobre a formação de biofilmes. De acordo com esses autores, a taxa de morte de biofilme formado por *S. aureus* em 24 horas, tratado com os óleos essenciais, revelou redução parcial (50%) de biomassa metabólica.

6.7.3. *Staphylococcus pseudintermedius* (SP2)

Assim como em *S. aureus*, as células não tratadas (controle) de *S. pseudintermedius*, foram capazes de se aderir à lamínula e formar o biofilme. Nos tratamentos com gentamicina, extrato de *H. sabdariffa* e HPAs, a bactéria não foi mais capaz de formar tal comunidade microbiana, como pode observar pela presença de células aderidas, mas de maneira isolada. Principalmente nos tratamentos com os HPAs, observaram restos celulares aderidos a lamínula juntamente com células aparentemente intactas (Figura 30).

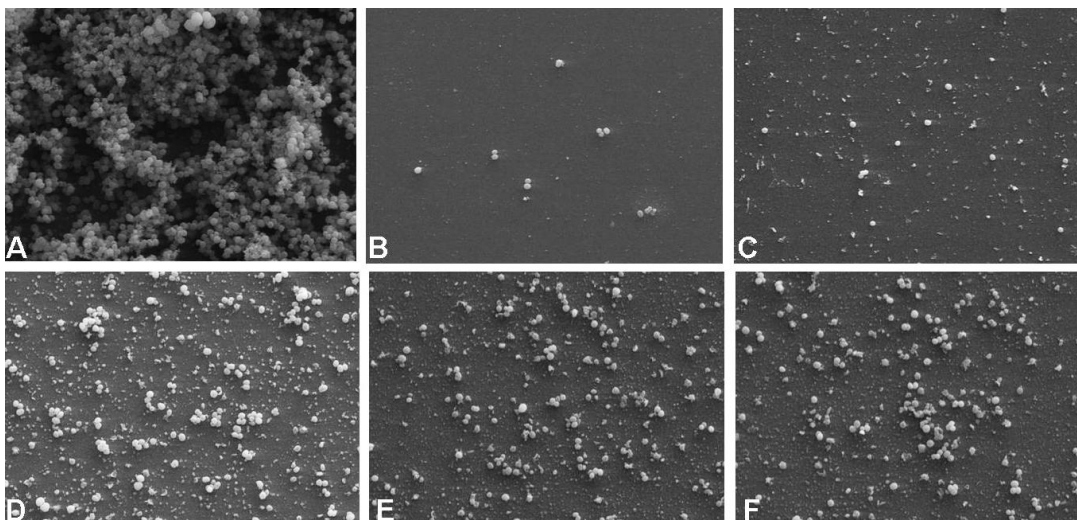


Figura 30: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *S. pseudintermedius* (SP2): (A) Controle (sem tratamento); (B) Tratada com gentamicina [10 μ g/mL]; (C) Tratada com extrato de *H. sabdariffa* [5,3mg/mL]; (D) Tratada com Ag₃[PMo₁₂O₄₀] [0,028 μ mol/mL]; (E) Tratada com Ag₃[PW₁₂O₄₀] [0,028 μ mol/mL]; (F) Tratada com Ag₄[SiW₁₂O₄₀] [0,028 μ mol/mL].

No trabalho de Singh e colaboradores (2013) foi avaliada a capacidade de formação de biofilme de isolados clínicos de *S. pseudintermedius* obtidos de cães. Esses autores relataram que 96% (136/140) dos isolados de *S. pseudintermedius* foram classificados como produtores de biofilmes, não havendo diferença entre MRSP e MSSP.

Infecções de sítio cirúrgico causadas pela formação de biofilme resistente à meticilina *S. pseudintermedius* (MRSP) estão entre as infecções hospitalares mais comuns em animais de companhia (WEESE, 2008). No estudo de DiCicco e colaboradores (2012) foi avaliada a atividade *in vitro* da claritromicina, um antimicrobiano macrolídeo, na erradicação da formação de biofilme de MRSP em vários materiais. Microscopia eletrônica de varredura confirmou que a claritromicina em doses terapêuticas não erradicou o biofilme de MRSP formado em implantes ortopédicos. Song e colaboradores (2013) avaliaram a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de manuka (*Leptospermum scoparium*) contra *S. pseudintermedius* isolado da pele e ouvido de cães. A inibição da atividade do biofilme foi avaliada pelo ensaio colorimétrico de placa de microtitulação, onde comprovou-se que o óleo de manuka foi capaz de inibir a formação de biofilme de *S. pseudintermedius*, e a maioria das bactérias mostrou uma redução > 50%.

6.7.4. *Pseudomonas aeruginosa* ATCC9027

Na amostra não tratada (controle), observou-se a estrutura de biofilme de *P. aeruginosa* envolta por extensa matriz extracelular. Nos tratamentos com extrato de *H. sabdariffa* e HPA Ag₃[PW₁₂O₄₀], observou-se também a formação de biofilme, assim como no controle. No tratamento com o HPA Ag₃[PMo₁₂O₄₀], o biofilme se forma com menor intensidade, porém ainda havendo a presença de matriz extracelular. Já nos tratamentos com gentamicina e o HPA Ag₄[SiW₁₂O₄₀], *P. aeruginosa* não mais foi capaz de formar o biofilme, apresentando células aderidas, mas de maneira isolada (Figura 31).

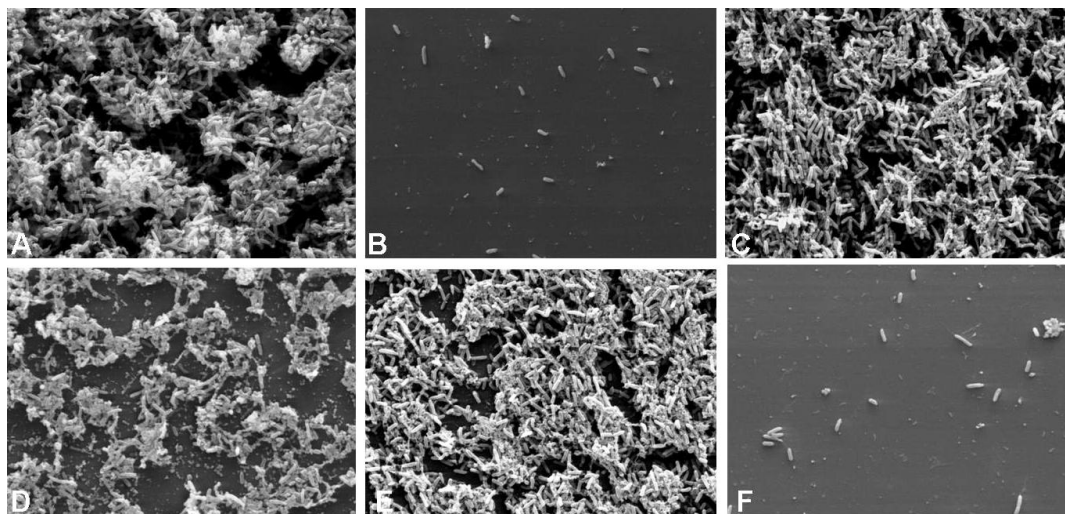


Figura 31: Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de *P. aeruginosa* ATCC9027: (A) Controle (sem tratamento); (B) Tratada com gentamicina [10µg/mL]; (C) Tratada com extrato de *H. sabdariffa* [5,3mg/mL]; (D) Tratada com Ag₃[PMo₁₂O₄₀] [0,028µmol/mL]; (E) Tratada com Ag₃[PW₁₂O₄₀] [0,028µmol/mL]; (F) Tratada com Ag₄[SiW₁₂O₄₀] [0,028µmol/mL].

O'toole e Kolter (1998) estudaram as características fundamentais para o desenvolvimento do biofilme de *P. aeruginosa*, e destacaram os flagelos, o pili IV e a motilidade por contração. Esta bactéria também produz uma cápsula polissacarídica (também conhecida como exopolissacarídeo mucoide ou capa de alginato), que ancora a bactéria às células epiteliais do hospedeiro, protege o microrganismo da fagocitose e da atividade dos antibióticos. Dessa forma, *P. aeruginosa* é um micro-organismo capaz de se aderir a diferentes superfícies e formar biofilme após poucas horas de inserção (MURRAY et al., 2003).

No trabalho de Girardello (2007) foi estudada a capacidade de formação de biofilme de 111 cepas de *P. aeruginosa* isoladas de pacientes com infecção urinária. Pela técnica de PCR este autor verificou a presença do gene *algC*, um dos genes responsáveis pela síntese do alginato, em todas as 111 cepas estudadas. As cepas apresentaram uma superfície celular altamente hidrofílica, fato que pode ser explicado pela produção de alginato. Por MEV, esse autor também observou a grande capacidade de *P. aeruginosa* em formar biofilme.

No trabalho de Kim e Park (2013) o gengibre, utilizado como erva medicinal para o tratamento de diversas doenças, foi avaliado para a capacidade de inibir a formação de biofilme *P. aeruginosa*. A análise estática demonstrou que o desenvolvimento do biofilme foi reduzido entre 39-56% quando o extrato de gengibre foi adicionado à cultura. Além disso, houve a diminuição da produção de substâncias poliméricas extracelulares, confirmada por análise química e microscopia eletrônica de varredura .

Trentin e colaboradores (2013) investigaram a capacidade de extratos do caule e da casca de *Anadenanthera colubrina*, *Commiphora leptophloeos* e *Myracrodruon urundeuva* em controlar o crescimento e evitar a formação de biofilme de *P. aeruginosa*. O crescimento das bactérias tratadas com os extratos foi inibido até 9h após a incubação, o que sugere uma atividade bacteriostática. Na microscopia eletrônica de varredura observou-se que a formação de biofilme foi fortemente impedida nas 6 primeiras horas de tratamento, em relação às células não tratadas. Após 24h de tratamento, os extratos continuaram a ser capazes de inibir a formação de biofilme. Porém nenhum efeito antibiofilme foi observado após 48h de incubação, diferentemente do resultado do presente trabalho, onde após 48h de incubação $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ foi capaz de impedir a formação de biofilme de *P. aeruginosa*.

7. CONCLUSÕES

A análise do perfil de resistência dos micro-organismos estudados mostrou que as duas cepas de *M. pachydermatis* foram resistentes ao fluconazol; todas as cepas de *Staphylococcus* spp. foram multirresistentes, ou seja, apresentaram resistência a mais de três antibacterianos; e as duas cepas de *P. aeruginosa* foram resistentes à cefotaxima. Na análise de PCR observou-se que *S. pseudintermedius* SP2 foi positivo para a presença do gene *mecA*, mesmo apresentando perfil fenotípico de sensibilidade à oxacilina.

O extrato de *H. sabdariffa* mostrou possuir ótima atividade antimicrobiana sobre todos os micro-organismos testados, apresentando CMI de 3,15mg/mL para *M. pachydermatis* e 5,3mg/mL para *S. aureus*, *S. pseudintermedius* e *P. aeruginosa*.

Das oito frações de *C. baccatum*, três apresentaram atividade sobre *M. pachydermatis*, IIP1, IIP2 e IIF1, com CMI de 20mg/mL. Para as bactérias, nenhuma das frações apresentou atividade.

Os HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, adicionados no tempo zero de incubação, apresentaram 100% de inibição sobre *S. aureus* e *S. pseudintermedius*. Para *P. aeruginosa* as porcentagens de inibição foram 98%, 99% e 99%, respectivamente. Já para *M. pachydermatis*, as porcentagens de inibição desses HPAs ficaram entre 96% e 98%. Apenas $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ não apresentou inibição satisfatória sobre esses micro-organismos, ficando sempre abaixo de 50% de inibição.

Os HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, adicionados na fase exponencial de crescimento, tiveram porcentagens que variaram entre 58% e 97% de inibição, e em alguns casos superando o efeito de gentamicina, utilizada como controle positivo para as bactérias. Assim como no ensaio citado anteriormente, apenas $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{10}\text{V}_2\text{O}_{40}]$ não apresentou resultado satisfatório sobre esses micro-organismos, mantendo porcentagem de inibição que variou entre 24% e 33%.

Na microscopia óptica de fluorescência observou-se que todos os compostos que apresentaram atividade sobre os micro-organismos foram capazes de permear a membrana plasmática, permitindo que o corante vital SYTOX® Green penetrasse na célula.

Na análise por microscopia eletrônica de transmissão observaram-se diversas alterações nas células após os tratamentos, principalmente sobre a parede celular, que na maioria dos tratamentos se encontrava rompida. Os HPAs $\text{Ag}_3[\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}]$, $\text{Ag}_3[\text{PW}_{12}\text{O}_{40}]$ e $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$, causaram uma divisão aberrante sobre *S. aureus*, sugerindo que tais compostos atingiram a glicosiltransferase dos peptidoglicanos, produzindo cadeias de peptidoglicanos mais curtas.

Na análise por microscopia eletrônica de varredura observou-se que todos os compostos, que apresentaram atividade, inibiram a formação da estrutura de biofilme em *M. pachydermatis*, *S. aureus* e *S. pseudintermedius*. Em *P. aeruginosa*, apenas o HPA $\text{Ag}_4[\text{SiW}_{12}\text{O}_{40}]$ foi capaz de impedir que o biofilme se formasse.

Portanto, os resultados obtidos revelam o grande potencial dos HPAs e do extrato de *H. sabdariffa* sobre *M. pachydermatis*, *S. aureus*, *S. pseudintermedius* e *P. aeruginosa*, e os extratos de *C. bacatum* sobre *M. pachydermatis*. Esta descoberta necessita mais estudos para identificação do grau da toxicidade desses compostos para os organismos superiores e do mecanismo de ação pelo qual inibem o crescimento de fungos e bactérias.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKERSTEDT, J.; VOLLSET, I. *Malassezia pachydermatis* whit special reference to canine skin disease. **Brit Vet J**, v.152, p.269-281, 1996.

AKINDAHUNSI, A.A.; OLALEYE, M.T. Toxicological investigation of aqueous methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa* L. **J. Ethno-pharmacol**, n. 89, p.161-164, 2003.

ALI, B.H.; AL WABEL, N.; BLUNDEN, G. Phytochemical, pharmacological and toxicological aspects of *Hibiscus sabdariffa* L.: a review. **Phytother Res.**, v.19, n.5, p.369-375, 2005.

ALTERTHUM, F. Mecanismo de ação dos antibacterianos e mecanismos de resistência. In: TRABULSI, L. R.; ALBERTHUM, F. **Microbiologia**, Ed. Atheneu, 4.ed., São Paulo, p.79-84, 2005.

ALVES, R.R.N.; SILVA, A.A.G.; SOUTO, W.M.S.; et al. Utilização e comércio de plantas medicinais em Campina Grande, PB, Brasil. **Rev Eletr Farm**, v.4, n.2, p.175-198, 2007.

AMARO, H.T.R. **Caracterização e padronização de testes para avaliação da qualidade fisiológica de sementes de vinagreira**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Montes Claros, 123p., 2010.

ANGUS, J.C. Otic cytology in health and disease. **Vet Clin North Amer Small Anim Pract.** v.34, n.2, p.411-424, 2004.

AUGUST, J.R. Enfermedades del oído. **Clin. Vet. North Am. Pract. Clin. Peq. Anim.**, v.18, p.1-274, 1993.

BANCROFT, E.A. Antimicrobial Resistance It's Not Just for Hospitals. **J Ame Med Assoc.** v.298, n.15, p.1083-4, 2007.

BANNERMAN, T.L.; HANCOCK, G.A.; TENOVER, F.C.; et al. Pulsed-field gel electrophoresis as a replacement for bacteriophage typing of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Microbiol.**, v.33, n.3, p.551-555, 1995.

BANNOEHR, J.; ZAKOUR, N.L.B.; WALLER, A.S.; et al. Population genetic structure of the *Staphylococcus intermedius* group: insights into agr diversification and the emergence of methicillin resistant strains. **J Bacteriol**, v.189, n.23, p.8685–8692, 2007.

BARRASA, J.L.M.; GOMEZ, P.L.; LAMA, Z.G.; et al. Antibacterial susceptibility patterns of *Pseudomonas* strains isolated from chronic canine otitis externa. **J. Vet. Med.**, n.47, p.191–196, 2000.

BASELGA, R. et al. Phase variation of slime production in *Staphylococcus aureus*: implications in colonization and virulence. **Infection and Immunity**, v.61, p.4857–4862, 1993.

BAU, E.P.L. **Atividade in vitro do heteropoliácido de sal de prata Ag3[PMo12O40] sobre as leveduras do gênero *Candida***. Monografia (Licenciatura em Biologia) - Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 32p., 2007.

BERNARDO, F.M.; MARTINS, H.M.; MARTINS, M.L. A survey of mycotic otitis externa of dogs in Lisbon. **Rev Iberoamer Micol**, n.15, p.163–165, 1998.

BIBERSTEIN, E.L.; HIRSH, D.C. In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y. C. **Microbiologia Veterinária**, Ed. Guanabara Koogan, 2.ed., Rio de Janeiro, p.108- 112, 2003.

BLUE, J.L. WOOLEY, R.E. Antibacterial sensitivity patterns of bacteria isolated from dogs with otitis externa. **J Amer Vet Med Assoc**. v.171, n.4, p.362-363, 1977.

BONATES, A. Otite: conhecimento detalhado permite diagnósticos precisos e sucesso no tratamento. **Vet. Rec.**, n. 62, p. 6-8, 2003.

BOND, R.; COLLIN, N.S.; LLOYD, D.H. Use of contact plates for the quantitative culture of *Malassezia pachydermatis* from canine skin. **J Small Anim Pract**. v.35, p.68-72, 1994.

BOND, R.; ANTHONY R.M. Characterization of markedly lipid-dependent *Malassezia pachydermatis* isolates from healthy dog. **J Applied Bacteriol**, v.78, p.537-542, 1995.

BOND, R.; LAMPORT, A.I.; LLOYD, D.H. Colonisation status of *Malassezia pachydermatis* on the hair and in the hair follicle of healthy beagle dogs. **Research Vet Sci**, v.68, p.291-293, 2000.

BORNAND, V. Bactériologie et mycologie de l'otite externe du chien. **Schweiz Archive Tierheilk**, v.134, p.1-8, 1992.

BOSLAND, P.W.; BAILEY, A.L.; IGLESIAS-OLIVAS, J. **Capsicum pepper varieties and classification**. Circular 530. Cooperative Extension Service. College of Agriculture and Home Economics; New Mexico State University, 1996.

BOUHDID, S.; ABRINI, J.; ZHIRI, A.; et al. Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. **J Appl Microbiol** v.106, p.1558–1568, 2009.

BUDZYNSKA, A.; WIECKOWSKA-SZAKIEL, M.; KALEMBA, B.D.; et al. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. **Polish J Microbiol**, v.60, n.1, p.35-41, 2011.

CAIXETA, D.S. **Sanificantes químicos no controle de biofilmes formados por duas espécies de *Pseudomonas* em superfície de aço inoxidável**.

Dissertação de Mestrado em Microbiologia Agrícola, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 75p., 2008.

CAIXETA, D.S.; SCARPA, T.H.; BRUGNERA, D.F.; et al. Chemical sanitizers to control biofilms formed by two *Pseudomonas* species on stainless steel surface. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, 32(1): 142-150, 2012.

CAFARCHIA, C.; FIGUEREDO, L.A.; FAVUZZI, V.; et al. Assessment of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* in various media using a CLSI protocol. **Vet Microbiol**, n.159, p.536–540, 2012.

CANIZZO, F. T.; ERASO, E.; EZKURRA, P. A.; et al. Biofilm development by clinical isolates of *Malassezia pachydermatis*. **Med Mycol**, n.45, p.357-361, 2007.

CARDOSO, M.O. **Hortaliças não-convencionais da Amazônia**. Embrapa-SPI, 1997.

CARLOTTI, D.N. Canine and feline superficial fungal skin infections. **Vet Quarterfly**, v.19, sup. 1, p.45-46, 1997.

CARVALHO, H.H.; WIEST, J.M.; CRUZ, F.T. Atividade antibacteriana in vitro de pimenta e pimentões (*Capsicum sp.*) sobre quatro bactérias toxinfecivas alimentares. **Rev Bras Plant Medicin**, n.12, p.8-12, 2010.

CAVALCANTE, R.V.; SOUZA, V.A.S.; NETO, O.L.S.; et al. Principais agentes causadores de otite canina identificados no Laboratório de Doenças Infecto-Contagiosas dos Animais Domésticos/UFRPE. **X Jornada de Ensino, Pesquisa e Extensão – JEPEX**, UFRPE, Recife, 2010.

CEFAI, C.; ASHURST, A.S.; OWENS, C. Human carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* linked with a pet dog. **Lancet**, n.344, p.539–40, 1994.

CHANG, H.J.; MILLER, H.L.; WATKINS, N.; et al. An epidemic of *Malassezia pachydermatis* in an intensive care nursery associated with colonization of health care workers' pet dogs. **New Engl J Med**. v.338, n. 11, p. 706- 711, 1998.

CHEN, M.; YANG, Z.; WU, H.; et al. Antimicrobial activity and the mechanism of silver nanoparticle thermosensitive gel. **Inter J Nanomed**, v.6, p.2873–2877, 2011.

CIZMAN, M. The use and resistance to antibiotics in the community. **Intern J Antimicrob Agen**, v.21, n.4, p.297-307, 2003.

CLSI (Clinical Laboratory Standards Institute). Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; Twenty-second informational supplement (M100-S22). **Clinical Laboratory Standards Institute**, Wayne, Pennsylvania, USA; v. 32, n.3., 2012.

COLE L.K.; KWOCZKA, K.W.; KOWALSKI, S.J. et al. Microbial flora and antimicrobial susceptibility patterns of isolated pathogens from the horizontal ear and middle ear dogs with otitis media. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.212, p.534-538, 1998.

CONCEIÇÃO, L.G.; FABRIS, V.E. Piodermite canina: parte I. **Cães e Gatos**. n.85, p. 35-39, 1999.

CORREA, W.M.; CORREA, C.N.M. **Enfermidades infecciosas dos mamíferos domésticos**, Ed. Medsi, 2ed., Rio de Janeiro, 1992.

COSTERTON, J.W.; LEWANDOWSKI, Z.; CALDWELL, D.E.; et al. Microbial biofilms. **An. Rev. Microbiol.** n.49, p. 711-745, 1995.

COSTERTON, J.W., STEWART, P.S., GREENBERG, E.P. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. **Sci**, v.284, p.1318–1322, 1999.
CRUZ, F.T.; CARVALHO, H.H.C.; WIEST, J.M. Avaliação da atividade antibacteriana de pimentas (*Capsicum* sp) e sua relação com o teor de capsaicinóides. In: **Salão de Iniciação Científica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre**, Ed. da UFRGS, v.1, p.503, 2003.

CUENCA-ESTRELLA, M.; RODRIGUEZ-TUDELA, J.L. The current role of the reference procedures by CLSI and EUCAST in the detection of resistance to antifungal agents in vitro. **Exp Rev Anti-Infect Ther**, n.8, p.267–76, 2010.

DAVEY, M.E.; O'TOOLE, G.A. Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. **Microbiol mol biol rev**, n.64, p.847-867, 2000.

DIAS, A. D., et al. Atividade de heteropoliácidos sobre *Candida albicans*. In: **27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latinoamericano de Química**, Salvador, 2004a.

DIAS, A. D., et al. Atividade de heteropoliácidos sobre *Staphylococcus aureus*. In: **27ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química e XXVI Congresso Latinoamericano de Química**, Salvador, 2004b.

DICKSON, D.B; LOVE, D.N. Bacteriology of the horizontal ear canal of dogs. **J. Small Anim. Pract.** n.24, p. 413-421, 1983.

DICICCO, M.; NEETHIRAJAN, S.; SINGH, A.; et al. Efficacy of clarithromycin on biofilm formation of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **BMC Vet Reser**, v.8, n.225, 2012.

DIECKMANN, A. M.; TORRES, H.M.; FERREIRA, T.; et al. Aspectos clínicos e avaliação antibacteriana terapêutica da otite externa em cães. **Rev. Bras. Med. Vet.** v.18, n.6, p.242-245, 1996.

DIZ, M.S.S; CARVALHO, A.O.; RODRIGUES, R.; et al. Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and

inhibits the acidification of the medium by yeast cells. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1760, p.1323–1332, 2006.

DUIJKEREN, E.; WOLFHAGEN, M.J.; HECK, M.E.O.C.; et al. Transmission of a Pantón–Valentine leucocidin positive methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* strain between humans and a dog. **J Clin Microbiol**, n.43, p.6209–11, 2005.

DUIJKEREN, E.; CATRY, B.; GREKO, C.; et al. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **J. Antimicrob. Chemother.** v.66, n.12, p.2705-2714, 2011.

DUNNE, W.M. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately? **Clin microbiol rev**, n.15, p.155-166, 2002.

DUQUETTE, R. A.; NUTTALL, T. J. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in dogs and cats: an emerging problem? **J. Small Anim. Pract.**, n.45, p.591-597, 2004.

EHRlich, G. D.; VEEH, R.; WANG, X.; et al. Mucosal biofilm formation on middle-ear mucosa in the chinchilla model of otitis media. **J. Am. Vet. Med. Assoc.** v.287, n.13, p.1710-1715, 2002.

EICHENBERG, M.L.; APPELT, C. E.; BERG, V.; et al. Suscetibility of *Malassezia pachydermatis* to azole antifungal agent evaluate by a new broth microdilution method. **Acta Scientiae Veterinaria** v.31, n.2, p.75-80, 2003.

FARIAS, M.F. **Terapêutica Otológica** In: Manual de Terapêutica Veterinária. Ed.Roca, Rio de Janeiro, 720p., 2002.

FENG, Q.L.; WU, J.; CHEN, G.Q.; et al. A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*. **J. Biomed. Mater. Res.** v.52, p.662–668, 2008.

FERA, M.T., CAMERA, E.L.C., DE SARRO, A. New triazoles and echinocandins: mode of action, in vitro activity and mechanisms of resistance. **Expert Rev. Anti Infect. Ther.** v.7, p.981–998, 2009.

FERGIE, N.; BAYSTON, R.; PEARSON, J.P.; et al. Is otitis media with effusion a biofilm infection? **Clin. Otolaryngol. Al. Sci.** v.1, n.29, p.38-46, 2004.

FIGUEREDO, L.A.; CAFARCHIA, C.; DESANTIS, S. Biofilm formation of *Malassezia pachydermatis* from dogs. **Vet Microb**, v.160, p.126–131, 2012.

FIGUEREDO, L.A.; CAFARCHIA, C.; OTRANTO, D. Antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* biofilm. **Med Mycol**, v.51, n.8, p.863-867, 2013.

FOX, C.L.JR. Silver sulfadiazine - a new topical therapy for *Pseudomonas* in burns. Therapy of *Pseudomonas* infection in burns. **Arch Surg.**, v.96, p.184–188, 1968.

FREEMAN, D.J.; FALKINER, F.R.; KEANE, C.T. New method for detecting slime production by coagulase negative staphylococci. **J. Clin. Pathol.**, n.42, p.872-874, 1989.

GIANNOULI, S.; LABROU, M.; KYRITSIS, A.; et al. Detection of mutations in the FemXAB protein family in oxacillin-susceptible mecA-positive *Staphylococcus aureus* clinical isolates. **J Antimicrob Chemother**, v.65, p.626–633, 2010.

GINEL, P.J.; LUCENA, R.; RODRIGUES, J.C. et al. A semiquantitative cytological evaluation of normal and pathological samples from the external ear canal of dogs and cats. **Vet. Dermatol.**, v.13, p.151-156, 2002.

GIRARDELLO, R. **Estudo da formação de biofilme por cepas de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de infecção urinária.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual de Londrina, 41p., 2007.

GOMES, J.J.A., et al. Diversidade e distribuição vertical de ácaros em variedades de vinagreiras (*Hibiscus sabdariffa*) em São Luís (MA). **III SIBAC - Símposio Brasileiro de Acarologia**, Campinas, 2011.

GOSSANI, C.M.D.; MATHIAS, L.S.; PASSONI, L.C.; et al. Atividade de Heteropolíácidos sobre fungos e bactérias de importância veterinária. In: **II Congresso Fluminense de Iniciação Científica e Tecnológica**, Campos dos Goytacazes, 2010.

GOTTHELF, L. N. **Small animal ear disease.** Ed. Saunders, Philadelphia, 270p, 2000.

GREENE, C. E. **Enfermidades infecciosas: perros y gatos.** Ed. Interamericana, São Paulo, 1993.

GRIFFIN, C. Limpeza e terapia tópica das otites. **H Vet**, v.94, p.17-25, 1996.

GRONO, L.R. Studies of the microclimate of the external auditory canal in the dog. III: Relative humidity within the external auditory meatus. **Res. Vet. Sci.** v.11, p.316-319, 1970.

GRONO, L.R. Otite externa. In KIRK, R.W.: **Atualização Terapêutica Veterinária.** Ed. Manole, São Paulo, p.511-516, 1984.

GUARDABASSI, L.; SCHWARZ, S.; LLOYD, D.H. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. **J Antimicrob Chemother** n.54, p.321–332, 2004.

GUARDABASSI, L.; HOUSER, G.A.; FRANK, L.A.; et al. Orientações para o uso de antimicrobianos em cães e gatos. In GUARDABASSI, L.; JENSEN, L. B.; KRUSE, H. **Guia de antimicrobianos em veterinária.** Ed. Artmed, 1.ed. Porto Alegre, 2010.

GUILLOT, J.; GUÉHO, E.; LESOURD, M.; et al. Identification of *Malassezia* species: a practical approach. **J Mycol Med**, v.6, p.103-110, 1996.

HANCOCK, R.E.W. Resistance mechanisms in *Pseudomonas aeruginosa* and other nonfermentative gram-negative bacteria. **Clin Infect Dis**, n.27, p.93-99, 1998.

HANSELMAN, B.A.; KRUTH, S.; WEEAE, J.S. Methicillin-resistant staphylococcal colonization in dogs entering a veterinary teaching hospital. **Vet. Microbiol.** v.126, p.277-281, 2008.

HARVEY, R.G.; HARARI, J; DELAUCHE, A.J. **Doenças de ouvido em cães e gatos**, Ed. Revinter, Rio de Janeiro, 272p, 2004.

HAUSCHILD, T.; WÓJCIK, A. Species distribution and properties of staphylococci from canine dermatitis. **Res Vet Sci**, n.82, p.1-6, 2007.

HAWSER, S.P.; DOUGLAS, L.J. Biofilm formation by *Candida* species on the surface of catheter materials in vitro. **Infect. Immun.** v.62, p.915-921, 1994.

HILL, C.L., et al. Polyoxometalates in Medicine. **Chem. Rev.**, n.98, p.327-357, 1998.

HYO, Y.; YAMADA, S.; ISHIMATSU, M.; et al. Antimicrobial effects of Burow's solution on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. **Med Mol Morphol.**, v.45, p.66-71, 2012.

HOSEIN, I. K.; HILL, D. W.; JENKINS, L. E.; et al. Clinical significance of the emergence of bacterial resistance in the hospital environment. **Symp. Ser. Soc. Appl. Microbiol.**, , n. 31, p. 90S-97S, 2002.

HOSOSAKA, Y.; HANAOKI, H.; ENDO, H.; et al. Characterization of oxacillin-susceptible *mecA*-positive *Staphylococcus aureus*: a new type of MRSA. **J Infect Chemother**, v.13, p.79-86, 2007.

HUANG, H.P.; LITTLE, C.J.L. Effects of fatty acids on the growth and composition of *Malassezia pachydermatis* and their relevance to canine otitis externa. **Res Vet Sci.** n.55, p. 119-123, 1993.

HWANG, J.H.; CHU, C.K.; LIU, T.C. Changes in bacteriology of discharging ears. **J Laryngol Otol.**, v.116, n.9, p.686-9, 2002.

ISHIHARA, K.; SHIMOKUBO, N.; SAKAGAMI, A.; et al. Occurrence and molecular characteristics of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in an academic veterinary hospital. **Appl Environ Microbiol**, n.76. p.5165-5174, 2010.

JANNATI, E.; ARZANLOU, M.; HABIBZADEH, S.; et al. Nasal colonization of *mecA*-positive, oxacillin-susceptible, methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*

isolates among nursing staff in an Iranian teaching hospital. **Am J of Infec Cont**, v.41, p.1122-1124, 2013.

JANSEN, R.J.J. et. al. Recent (1987-1993) developments in heteropolyacid catalysts in acid catalyzed reactins and oxidatin catalysis. **Rec. des Trav. Chim. des Pays-Bas**, n.113, p.116-120, 1994.

JEPRAS, R.J.; CARTER, J.; PEARSON, S.C.; et al. Development of a robust flow cytometric assay for determining number of viable bacteria. **Appl Environ Microbiol**, 61:2696–2701, 1995.

JEVONS, M. P. “Celbenin”-resistant staphylococci. **Br. Med. J.**, v. 1, p. 124-5, 1961.

JONADET, M.; BASTIDE, J.; BASTIDE, P.; et al. *In vitro* enzyme inhibitory and *in vivo* cardio-protective activities of *Hibiscus sabdariffa* L. **J. Pharmacol. Belgium**, v.45, n.2, p.120- 124, 1990.

JONES, R.D.; KANIA, S.A.; ROHRBACH, B.W., et al. Prevalence of oxacillin- and multidrug-resistant staphylococci in clinical samples from dogs: 1,772 samples (2001-2005). **J Amer Vet Med Assoc**, v.230, n.2, p.221-227, 2007.

JUNG, E.; KIMB, Y.; JOO, N. Physicochemical properties and antimicrobial activity of Roselle (*Hibiscus sabdariffa* L.). **J Sci Food Agric**, v.5, p.168-171, 2013.

KANIA, S.A.; WILLIAMSON, N.L.; FRANK, L. A.; et al. Methicillin resistance of staphylococci isolated from the skin of dogs with pyoderma. **Amer J Vet Resear**, v.65, n.9, p.1265-1268, 2004.

KAMPF, G.; ADENA, S.; RUDEN, H.; et al. Inducibility and potential role of MecA-gene-positive oxacillin-susceptible *Staphylococcus aureus* from colonized healthcare workers as a source for nosocomial infections. **J Hosp Infect**, v.54, p.124–129, 2003.

KAPPEL, V.D.; COSTA, G.M.; SCOLA, G.; et al. Phenolic content and antioxidant and antimicrobial properties of fruits of *Capsicum baccatum* L. var. *pendulum* at different maturity stages. **J Med Food.**, v.11, n.2, p267-74, 2008.

KESKIN, D.; TOROGLU, S. Studies on antimicrobial activities of solvent extracts of different spices. **J Environ Biol**,v.32, n.2, p.251-256, 2011.

KIEDROWSKI, M.R.; HORSWILL, A.R. New approaches for treating staphylococcal biofilm infections. **Ann. N.Y. Acad. Sci.** v.1241, p.104–121, 2011.

KIM, H-S.; PARK, H-D. Ginger Extract Inhibits Biofilm Formation by *Pseudomonas aeruginosa* PA14. **PLoS One**, v.8, n.9, 2013.

KISS, G.; RADVANYI, S.Z.; SZIGETI, C. New combination for the therapy of canine otitis externa. I. Microbiology of otitis externa. **J. Small Anim. Pract.** n.38, p.51–56, 1997.

KLOOS, W. E.; BANNERMAN, T. L. *Staphylococcus* and *Micrococcus*. In: MAHON, C. R.; MANUSELIS Jr., G. **Textbook of diagnostic microbiology**. Ed. Saunders, New York, p. 264-77, 1995.

KLOOS, W. E. Taxonomy and systematics of staphylococci indigenous to humans: **The staphylococci in human disease**. Ed. Churchill Livingstone, New York, p.113-38, 1997.

KONEMANN, E.W.; ALLEN, S.D.; JANDA, W.M.; et al. **Diagnóstico Microbiológico**, Ed. MEDJI, New York, 2000.

LACAZ, C.S.; PORTO, E.; MARTINS, J.E.C.; et al. **Tratado de Micologia Médica Lacaz**. Ed. Sarvier, São Paulo, 1104p., 2002.

LANGONI, H.; FESSEL, Y.M.N.; LISTONI, F.J.P.; et al. Microflora aeróbica de ouvido de cães sem otite. **Arq Bras Med Zootec**, v.43, n.3, p.255-260, 1991.

LEAL, R.S., MACIEL, M.A.M.; DANTAS, T.N.C.; et al. Perfil etnobotânico e atividade antioxidante de *Cleome spinosa* (Brassicacea) e *Pavonia varians* (Malvaceae). **Rev Fitos**, v.3, n.3, p.25-31, 2007.

LEITE, C.A.L. **Entendendo a otite externa de cães & gatos: um guia prático para o profissional veterinário**. Editora da Universidade Federal de Lavras, Lavras, 39p., 2000.

LEITE, C. A. L. **Caracterização clínica e laboratorial de caninos hígidos e otopatas,, com ênfase nas microbiotas aeróbica e anaeróbica dos condutos auditivos**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual Paulista, 237p., 2003a.

LEITE C.A.L. A avaliação radiográfica no diagnóstico da otite média em caninos e felinos. **Rev Bras Med Vet – Peq Anim Estim**, v.1, n.1, p.35-43, 2003b.

LILENBAUM, W.; VERAS, M.; BLUM, E. et al. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococci* isolated from otitis externa in dogs. **Lett. Appl. Micol.**, v.31, p.42-45, 2000.

LITTLE, C.J.L.; LANE, J.G. An evaluation of tympanometry, otoscopy and palpation for assessment of the canine tympanic membrane. **Vet. Rec.**, v.124, n.1, p.5-8, 1989.

LITTLE, C.J.; LANE, J.G.; PEARSON, G.R. Inflammatory middle ear disease of the dog: the pathology of otitis media. **Vet. Rec.** v.128, n.13, p.293-296, 1991.

LIU, J. et. al. Antiviral activity of mixed-valence rare earth borotugstate heteropoly blues against influenza virus in mice. **Antiv. Chem. & Chemioth.**, 11: 367-372, 2000.

LIU, K.S., TSAO, S.M., YIN, M.C. In vitro antibacterial activity of roselle calyx and protocatechuic acid. **Phytoh Resear**, v.19, p.942-945, 2005.

LOEFFLER, A., BOAG, A. K., SUNG, J., ET AL. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* among staff and pets in a small animal referral hospital in the UK. **J Antimicrob Chemoth**, v.56, p.692-697, 2005.

LOGAS, D.B. Diseases of the ear canal. **Vet Clin North Amer S Anim Pract**. v.5, n.24, p. 905, 1994.

LORENZI, H., MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil, nativas e exóticas**. Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002.

LOWY, F. D. Antimicrobial resistance: the exemple of *Staphylococcus aureus*. **J. Clin. Invest.**, v. 111, p. 1265-73, 2003.

MCCARTHY, A.J.; LINDSAY, J.A.; LOEFFLER, A. Are all meticillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) equal in all hosts? Epidemiological and genetic comparison between animal and human MRSA. **Vet Dermatol**, v.23, n.4, p. 267–e54, 2012.

MACIEL, M.J. **Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffae* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante em alimentos**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011.

MAGALHÃES, M.J.; SILVA, N.; MARQUES Jr, A.P. Otite externa em cães atendidos no Hospital Veterinário da UFMG. Etiologia, frequência e sensibilidade antibiótica. **Arq Bras Med Vet Zootec**, v.37, n.4, p.333-341, 1985.

MAKSIMOV, G.M. Advances in the syntesis of polyoxometalates and in the study of heteropolyacids. **Rus. Chem. Rev.**, n.64, p.445-456, 1995.

MANSFIELD, P.D.; BOOSSINGER, T.R.; ATTLELERGER, M.H. Infectivity of *Mallassezia pachydermatis* in the external ear canal of dogs. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, v.26, p.97-100, 1990.

MASON, K.V.; EVANS, A.G. Dermatitis associated with *Malassezia pachydermatis* in 11 dogs. **J Amer Anim Hosp Assoc**. v. 27, p.13-20, 1991.

MASUDA, A.; SUKEGAWA, T.; MIZUMOTO, N.; et al. Study of lipid in the ear canal in canine otitis externa with *Malassezia pachydermatis*. **J Vet Med Sci**. v.11, n.62, p.1177-1182, 2000.

MASUDA, A.; SUKEGAWA, T.; TANI, H.; et al. Attachment of *Malassezia pachydermatis* to the ear dermal cells in canine otitis externa. **J Vet Med Sci**. v.63, n.6, p.667-669, 2001.

MATHIAS, L. S. **Bioatividade de moléculas naturais e compostos sintéticos sobre o fungo *Sporothrix schenckii***. Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – UENF, 146p, 2010.

MATSUMURA, Y.; YOSHIKATA, K.; KUNISAKI, S.; et al. Mode of bacterial action of silver zeolite and its comparison with that of silver nitrate. **Appl. Environ. Microbiol.** v.69, p.4278–4281, 2003.

MEKIC, S.; MATANOVIC, K.; SEOL, B. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* isolates from dogs with otitis externa. **Vet Rec** v.169, n.125, 2011.

MELCHIOR, M.B.; VAARKAMP, H.; FINK-GREMMELS, J. Biofilms: a role in recurrent mastitis infection? **Vet J**, v.171, p.398–407, 2006.

MICAS, A.F.D. **Avaliação da atividade bactericida e bacteriostática da violaceína**. Dissertação de Mestrado, Universidade de Campinas - Unicamp, 78p., 2008.

MILAGRES, L.; GARCIA, D.; CASTRO, T.; et al. Infecção pulmonar por *Pseudomonas aeruginosa* na fibrose cística: diagnóstico sorológico e conduta. **Pediatria**, v.30, n.1, p.56-65, 2008.

MILLON, L.; MANTEAUX, A.; REBOUX, G.; et al. Fluconazole resistant recurrent oral candidiasis in human Immunodeficiency virus-positive patients: Persistence of *Candida albicans* strain with the same genotype. **J Clin Microbiol** v.32, n.4, p.1115-1118, 1994.

MOREILLON, P. Bacterial resistance to antibiotics. **Schweiz Med. Wochenschr**, v.125, n.23, p.1151-61, 1995.

MOREIRA, G.R.; CALIMAN, F.R.B.; SILVA, D.J.H.; et al. Espécies e variedades de pimenta. **Inf Agrop**, v.27, p.16-29. 2006.

MOREIRA, C.A.; OLIVEIRA, L.C.; MENDES, M.S.; et al. Biofilm production by clinical staphylococci strains from canine otitis. **Braz J Microbiol**, v.43, p.371-374, 2012.

MORENO, J.M.; SOLER, M; RIERA, L.L.; et al. Sensibilidad *in vitro* a la enrofloxacin de bacterias aisladas de otitis externas en perros y gatos. **Vet Prax** n.10, p.14–16, 1995.

MORGAN, M. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and animals: zoonosis or humanosis? **J Antim Chemoth** n.62, p.1181–1187, 2008.

MORRIS, D. O.; ROOK, K. A.; SHOFER, F. S.; et al. Screening of *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus intermedius*, and *Staphylococcus schleiferi* isolates obtained from small companion animals for antimicrobial

resistance: a retrospective review of 749 isolates (2003–2004). **Vet Dermatol**, v.17, n.5, p.332–337, 2006.

MUELLER, E.N. **Avaliação e tratamento da otite externa canina**. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Faculdade de Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 91f, 2009.

MUELLER, E.N.; GUIOT, Ê.G.; TILLMANN, M.T.; et al. Avaliação do efeito da lavagem do canal auditivo externo em orelhas com otite externa purulenta bilateral. **Medvep**, v.9, n.28, p.147-150, 2011.

MULLER, G.H.; KIRK, R.W.; SCOTT, D.W. Ear dermatoses. In: **S Anim Dermatol**, Ed. Saunders, 4ed, Philadelphia, p.807-827, 1989.

MURPHY, K.M. A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. **Clin. Tech. Small Anim. Pract.** v.4, n.16, p.236-241, 2001.

MURRAY, P. R.; BARON, E. J., Jorgensen J H, et al. **Manual of Clinical Microbiology**, 8th Edition, v. 1, p. 719–725. 2003.

MURRAY, P.R.; ROSENTHAL, K.S.; PFALLER, M.A. **Microb Méd** Ed. Elsevier, 6ed, Rio de Janeiro, 2010.

NAKANO, Y.; WADA, M.; TANI, H.; et al. Effects of β -Thujaplicin on anti-*Malassezia pachydermatis* remedy for canine otitis externa. **J Vet Med Sci**, v.12, n. 67, p. 1243-1247, 2005

NASCENTE, P.S.; NOBRE, M.O.; MEINERZ, A.R.M.; et al. Ocorrência de *Malassezia pachydermatis* em cães e gatos. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.26, n.2, p.79-82, 2004.

NASCENTE, P.S.; MEINERZ, A.R.M.; FARIA, R.O. et al. CLSI broth microdilution method for testing susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to thiabendazole. **Braz J Microbiol**, n.40, p.222–226, 2009.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; **14th informational supplement**. Document M100-S14. NCCLS, 2004.

NEDER, R. N. **Microbiologia: Manual de Laboratório**. Ed. Nobel, São Paulo, p.71-73, 1992.

NEWMAN, D.J., CRAGG, G.M. Natural products as source of new drugs over the last 25 years. **J. Nat. Product.**, n.70, p.461-477, 2007.

NIJIMA, M.; KANO, R.; NAGATA, M.; et al. An azole-resistant isolate of *Malassezia pachydermatis*. **Vet Microbiol**, n.149, p.288-290, 2011.

NOBRE, M.O.; CASTRO, A.P.; NASCENTE, P.S. et al. Occurrence of *Malassezia pachydermatis* and others infectious agents as cause external otitis

in dogs from Rio Grande do Sul State, Brazil (1996/1997). **Braz. J. Microbiol.**, v.32, p.245-249, 2001.

NOGUEIRA, J.C.R.; DINIZ, M.F.M.; LIMA, E.O. Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos vegetais em otite externa aguda. **Rev Bras Otorrinolaringol**, v.74, n.1, p.118-24, 2008.

NUTTALL, T.; COLE, L. Ear cleaning: the UK and US perspective. **Vet Dermatol**. v.15, p.127-136, 2004.

ODIGIE, I.P.; ETTARH, R.R.; ADIGUN, S.A. Chronic administration of aqueous extract of *Hibiscus sabdariffa* attenuates hypertension and reverses cardiac hypertrophy in 2K-1C hypertensive rats **J. Ethnopharmacol**, v.86, n.3, p.181-185, 2003.

OJIMA, I. Modern Natural products chemistry and drug discovery. **J. Med. Chem.**, v.51, n.9, p.2587-2588, 2008.

OLALEYE, M. T. Cytotoxicity and antibacterial activity of methanolic extract of *Hibiscus sabdariffa*. **J Medic Plant Res**, v.1, n.1, p.9-13, 2007.

OLIVEIRA, L.C.; MEDEIROS, C.M.O.; SILVA, I.N.G.; et al. Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.57, n.3, p.405-408, 2005.

OSLAND, A.M.; VESTBY, L.K.; FANUELTSEN, H.; et al. Clonal diversity and biofilm-forming ability of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. **J Antimicrob Chemother.**, v.67, n.4, p.841-848, 2012.

O'TOOLE, G. A.; KOLTER, R. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. **Mol. Microbiol.**, v.30, p.295-304, 1998.

OVERMAN, P.R. Biofilm: a new view of plaque. **J Contemp Dent Pract**. v.1, n.3, p.18-29, 2000.

PAUL, N.C.; MOODLEY, A; GHIBAUDO, G.; et al. Carriage of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in small animal veterinarians: indirect evidence of zoonotic transmission. **Zoon Pub Health**, n.58, p.533-539, 2011.

PEANO, A.; BECCATI, M.; CHIAVASSA, E.; et al. Evaluation of the antifungal susceptibility of *Malassezia pachydermatis* to clotrimazole, miconazole and thiabendazole using a modified CLSI M27-A3 microdilution method. **Vet Dermatol**, n.23, p.131-135, 2011.

PENNA, B.; MENDES, W.; RABELLO, R.F.; et al. Isolation of methicillin-resistant staphylococci in canine skin infections in Rio de Janeiro, Brazil. **Vet Dermatol**, v.24, p.373-375, 2013.

PERALVA DOS SANTOS, M.M. **Atividade Antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais das espécies *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana*, *Schinus terebinthifolius*, *Capsicum annuum*, e de análogos sintéticos da capsaicina frente aos micro-organismos da cavidade oral.** Tese de Doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 163p., 2010.

PETERSEN, A.D.; WALKER, R.D.; BOWMAN, M.M.; et al. Frequency of isolation and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus intermedius* and *Pseudomonas aeruginosa* isolates from canine skin and ear samples over a 6-year period (1992-1997). **J Amer Anim Hosp Assoc.** v.38, p.407-413, 2002.

PERRENTEN, V.; KADLEC, K; SCHWARZ, S.; et al. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. **J. Antimic. Chemo.**, v. 65, p.1145-1154, 2010.

PFALLER, M.A.; BALE, M.; BUSCHELMAN, B.; et al. Selection of candidate quality control isolates and tentative quality control ranges for *in vitro* susceptibility testing of yeast isolates by National Committee for Clinical Laboratory Standards proposed standard methods. **J. Clin. Microbiol.**, v.32, p.1650–1653. 1994.

POST, J.C. Direct evidence of bacterial biofilms in otitis media. **Laryng.** v.12, n.111, p. 2083-2094, 2001.

PRABHU, S.; POULOSE, E.K. Review: Silver nanoparticles: mechanism of antimicrobial action, synthesis, medical applications, and toxicity effects. **International Nano Letters**, v.2, p.32, 2012.

RAMAGE, G.; SAVILLE, S.P.; THOMAS, D.P.; LÓPEZ-BIBOT, J.L. Candida biofilms: an update. **Eukaryotic cell.** v.4, n.4, p.633-638, 2005.

REBETS, Y.; LUPOLI, T.; QIAO, Y.; et al. Moenomycin resistance mutations in *Staphylococcus aureus* reduce peptidoglycan chain length and cause aberrant cell division. **ACS Chem Biol.**, no prelo, 2013.

REIFSCHNEIDER, F.J.B; RIBEIRO, C.S.C. **Sistema de produção de pimentas (*Capsicum spp.*): Introdução e importância econômica.** Embrapa hortaliças, Sistema de Produção, 4 ISSN 1678 Versão eletrônica Dezembro/2004. Acesso em Novembro/2013.

RIBEIRO, S.F.F.; CARVALHO, A.O.; DA CUNHA, M.; et al. Isolation and characterization of novel peptides from chilli pepper seeds: Antimicrobial activities against pathogenic yeasts. **Toxicon**, v.50, p.600–611, 2007.

ROGGER, Y.S.; JOHN, L.I.; MARK, L.W. **Gen Microbiol.** Ed. Macmillan education, 5ed., London, p. 626-642, 1990.

ROSSER, E. J. Evaluación del paciente com otitis externa. **Pract Clin Peq Anim.** v.18, n.4, p.41-50, 1993.

ROSYCHUK, R.A.W. Management of otitis externa. **Vet Clin Nor Amer Small An Pract.** v. 24, n.5, p.921-951,1994.

ROUGIER, S.; BORELL, D.; PHEULPIN, S.; et al. A comparative study of two antimicrobial/anti-inflammatory formulations in the treatment of canine otitis externa. **Vet Dermatol**, v.5, n.16, p.299-307, 2005.

ROTH, R.A., HARKEMA, J.R., PESTKA, J.P.; et al. Is exposure to bacterial endotoxin a determinant of susceptibility to intoxication from xenobiotic agents? **Toxicol. Appl. Pharmacol.** 147:300–311, 1997.

RUKAYAD, Y.; SHIM, J-S.; HWANG, J-K. Screening of Thai medicinal plants for anticandidal activity. **Mycoses**, v.51, p.308–312, 2008.

RUSCHER, C.; LUBKE-BECKER, A.; WLEKLINSKI, C.G.; et al. Prevalence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* isolated from clinical samples of companion animals and equidae. **Vet Microbiol**, v.136, p.197–201, 2009.

SADER, H.S.; MENDES, C.F.M.; MONTELLI, A.; et al. Atividade antimicrobiana *in vitro* de cefpirona em comparação com outros betalactamicos de amplo espectro contra 804 amostras clínicas de nove hospitais brasileiros. **Ver. Ass. Méd. Bras.**, v.44, n.4, p.283-288, 1998.

SAIMAN, L.; SIEGEL, J. Infection control recommendations for patients with Cystic Fibrosis: microbiology, important pathogens, and infection control practices to prevent patient-to-patient transmission. **Am J Infect Control**, n.31(Suppl), p.47-52, 2003.

SANTIN, R.; MATTEI, A.S.; MUELLER, E.N.; et al. Malassezia pachydermatis isolada da cavidade oral de cães errantes da cidade de Pelotas-RS/Brasil. **Rev. Bras. Med. Vet.**, v.21, n.3, p.67-71, 2008.

SANTOS, M.M.P. **Atividade antimicrobiana *in vitro* de extratos vegetais das espécies *Mangifera indica*, *Eugenia jambolana*, *Schinus terebinthifolius*, *Capsicum annum*, e de análogos sintéticos da capsaicina, frente aos microrganismos da cavidade oral.** Tese de doutorado, Universidade Estadual do Norte Fluminense, 86p., 2010.

SANTOS, N.M.P. **Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato vegetal da espécie *Hibiscus sabdariffa* frente a microrganismos de interesse humano e veterinário.** Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Estadual do Norte Fluminense, 49p., 2013.

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

SASAKI, T., KIKUCHI, K., TANAKA, Y., et al. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. **J Clin Microbiol**, v.45, n.9, p.2770–2778, 2007.

SCOTT, G.M.; THOMSON, R.; MALONE, J.; et al. Cross-infection between animals and man: possible feline transmission of *Staphylococcus aureus* infection in humans? **J Hosp Infect**, n.12, p.29–34, 2001.

SEFTON, A. M. Mechanisms of antimicrobial resistance: their clinical relevance in the new millenium. **Drugs**, v.62, n.4, p.557-66, 2002.

SEOL, B.; NAGLIC, T.; MADIC, J.; et al. In vitro antimicrobial susceptibility of 183 *Pseudomonas aeruginosa* strains isolated from dogs to selected antipseudomonal agents. **J Vet Med, Series B** 49, p.188-192, 2002.

SHELL, L.G. Otitis media e interna. Etiologia, diagnóstico y tratamiento medico. **Lãs Clínicas Veterinárias de Norteamerica, Practica Clinica em Pequenos Animales**, v.18, n.4, p.181-197, 1993.

SIDRIM, J.J.C.; MOREIRA, J.L.B. **Fundamentos clínicos e laboratoriais da micologia médica**. Ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 287p., 1999.

SILVA, M.J.R. **Malassezia pachydermatis: suscetibilidade a compostos alternativos naturais e sintéitcos**. Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 81p., 2007.

SILVA, S.; HENRIQUES, M.; MARTINS, A.; et al. Biofilms of non-Candida albicans Candida species: quantification, structure and matrix composition. **Med. Mycol.** v.47, p.681–689, 2009.

SINGH, A.; WALKER, M.; ROUSSEAU, J.; et al. Characterization of the biofilm forming ability of *Staphylococcus pseudintermedius* from dogs. **BMC Vet Reser**, v.9, n.93, 2013.

SMARICK, S. Catheter-Related Bloodstream Infection. **Small Animal Critical Care Medicine**. p.498-500, 2008.

SOARES, C.S.T.S. **Estudo de resistência aos antimicrobianos em amostras de *Pseudomonas aeruginosa* isoladas de hospitais da cidade de Niterói-RJ**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal Fluminense, 78p, 2005.

SONDI, I.; SALOPEK-SONDI, B. Silver nanoparticles as antimicrobial agent: a case study on *E. coli* as a model for Gram-negative bacteria. **J. Colloid Interface Sci.**, v.275, p.177–182, 2004.

SONG, C-Y.; NAM, E-H.; PARK, S-H.; et al. In vitro efficacy of the essential oil from *Leptospermum scoparium* (manuka) on antimicrobial susceptibility and

biofilm formation in *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from dogs. **Vet Dermatol**, v.24, p.404–e87, 2013.

STEPHENS, C. Microbiology: breaking down biofilms. **Current Biology**. v.4, n.12, p.132-134, 2002.

STRUELENS, M.J.; HAWKEY, P.M.; FRENCH, G.L.; et al. Laboratory tools and strategies for methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* screening, surveillance and typing: state of the art and unmet needs. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.15, p.112-119, 2009.

TANNER, M.A.; EVERETT, C.L.; YOUVAN, D.C. Molecular phylogenetic evidence for noninvasive zoonotic transmission of *Staphylococcus intermedius* from a canine pet to a human. **J. Clin. Microbiol.**, v.38, p.1628-1631, 2000.

TATER, K.C., SCOTT, D.W.; MILLER, JR W.H.; et al. The cytology of the external ear canal in the normal dog and cat. **J Vet Med**. v.50, p.370-374, 2003.

TAVARES, W. Problem gram-positive bacteria: resistance in staphylococci, enterococci, and pneumococci to antimicrobial drugs. **Rev Soc Bras Med Trop**, n.33, p. 281-301, 2000.

THEVISSSEN, K.; TERRAS, F.R.; BROEKAERT, W.F. Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. **Appl Environ Microbiol** n.65; p.5451–5458, 1999.

TRAMPER-STRANDERS, G.A.; VAN DER ENT, G.K.; GERRITSEN, S.A. M.; et al. Macrolide-resistant *Staphylococcus aureus* colonization in Cystic Fibrosis patients: is there transmission to household contacts? **J Antimicrob Chemother**, v.60, n.3, p.665-668, 2007.

TRENTIN, D.S.; SILVA, D.B.; AMARAL, M.W.; et al. Tannins possessing bacteriostatic effect impair *Pseudomonas aeruginosa* adhesion and biofilm formation. **PLoS One**, v.8 n.6, 2013.

TSIGDINOS, G. A. Heteropoly compounds of Molybdenum and Tungsten. **Top. Curr. Chem.**, n.76, 1978.

TULESKI, G.L.R. **Avaliação da prevalência infecciosa e da sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos em otites de cães.** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, 167p., 2007.

TUNON G.I.L.; SILVA E.P.; FAIERSTEIN C.C. Isolamento de estafilococos multirresistentes de otites em cães e sua importância para saúde pública. **Bepa**, n.5, p.4-7, 2008.

VASIL, M.L. *Pseudomonas aeruginosa*: biology, mechanisms of virulence, epidemiology. **J Pediatr**. n.108, p.800-805, 1986.

VIEGAS JR, C., DA SILVA BOLZANI, V., BARREIRO, E.J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Quim. Nova**, v.29, n.2, p.326-337, 2006.

VIEIRA-DA-MOTTA, O.; SILVA, M.J.R.; DEUS, M.F.; et al. Atividade *in vitro* dos metabólitos secundários de *Burkholderia* sp. (BURKHOLDER 1950) sobre a levedura *Malassezia pachydermatis*. **Ciência Animal Brasileira**, v.9, n.2, p. 410-417, 2008.

WANG, C.J.; WANG, J.M.; LIN, W.L.; et al. Protective effect of hibiscus anthocyanins against tert-butyl hydroperoxide-induced hepatic toxicity in rats. **Food Chem Toxicol**, v.38, n.5, p.411-416, 2000.

WANG, X. et. al.. Synthesis, characterization and *in vitro* antitumor activity diorganometallo complexes -Keggin anions. **Inorg. Chem. Comm.**, n.4, p.372-374, 2001.

WEESE, J.S. A review of multidrug resistant surgical site infections. **Vet Comp Orthop Traumatol**, v.21, n.1,p.1-7, 2008.

WEESE, J.S.; VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. **Vet. Microbiol.** v.140, n.3, p.418-429, 2010.

WERCKENTHIN, C.; ALESIK, E.; GROBBEL, M., et al. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* from dogs and cats as well as *Arcanobacterium pyogenes* from cattle and swine as determined in the BfT-GermVet monitoring program 2004-2006. **J. Am. Vet. Med. Assoc.**, n.120, p.412-422, 2007.

WHITE, P.D. Medical management of chronic otitis in dogs. **Compendium.** v.21, n.8, p. 716-727, 1999.

WOODFORD, N. Biological counterstrike: Antibiotic resistance mechanisms of Gram-positive cocci. **Clin. Microbiol. Infect.**, v.11, n.3, p.2-21, 2005.

WONG, S.K., LIM, Y.Y., CHAN, E.W.C. Evaluation of antioxidant, anti-tyrosinase and antibacterial activities of selected *Hibiscus* species. **Ethnobotanical Leaflets**, v.14, p.781-796, 2010.

WRIGHT, B.; SHAH, P.N.; MCDONALD, L.J.; et al. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of silver carbene complexes derived from 4,5,6,7-tetrachlorobenzimidazole against antibiotic resistant bacteria. **Dalton Trans.**, v.21, p.6500-6506, 2012.

YAMASHITA, K.; SHIMIZU, A.; KAWANO, J.; et al. Isolation and characterization of Staphylococci from externa auditory meatus of dogs with or without otitis externa with special reference to *Staphylococcus schleiferi* subsp. *coagulans* isolates. **J Vet Med Sci**, v.67, n.3, p.263-268, 2005.

YI, S-M.; ZHU, J-L.; FU, L-I; et al. Tea polyphenols inhibit *Pseudomonas aeruginosa* through damage to the cell membrane. **Inter J of Food Microbiol.**, v.144, p.111–117, 2010.

YOSHIDA, G.; NAITO, F.; FUKATA, T. Studies of certain factors affecting the microenvironment and microflora of the external ear canal of the dog in health and disease. **J Vet Med Sci**, n.64, p.1145-1147, 2002.

YUJIE, L.; GENG, X.; HUANG, Y-C.; et al. The effect of brominated furanones on the formation *Staphylococcus aureus* biofilm on PVC. **Cell Biochem Biophys**, no prelo, 2013.

YUNES, R. A., CECHINEL FILHO, V. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Ed. Argos, 1ed., Chapecó, 2001.

XIAO, M.; WANG, Y.; YANG, Q.W.; et al. Antimicrobial susceptibility of *Pseudomonas aeruginosa* in China: a review of two multicentre surveillance programmes, and application of revised CLSI susceptibility breakpoints. **Int J Antimicrob Agents**, no prelo, 2012.

ZHANG, Y.L.; LI, J.T.; ZAO, M.W. Detection of Amp C in *Enterobacter cloacae* in China. **J. of Antimicrob. Agents**, v.18, p.365-371, 2001.

ZHANG, Y.Q.; WU, Q.P.; ZHANG, J.M.; et al. Effects of ozone on membrane permeability and ultrastructure in *Pseudomonas aeruginosa*. **J Appl Microbiol**, v.111, p.1006–1015, 2011.