



MARINA ROMANO DE OLIVEIRA

**OTITE CANINA EM ANIMAIS DE ABRIGO MUNICIPAL:
ETIOLOGIA E PERFIL DE SUSCETIBILIDADE A
ANTIMICROBIANOS E A ÓLEOS ESSENCIAIS**

**LAVRAS – MG
2022**

MARINA ROMANO DE OLIVEIRA

**OTITE CANINA EM ANIMAIS DE ABRIGO MUNICIPAL: ETIOLOGIA E PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS E A ÓLEOS ESSENCIAIS**

Projeto apresentado à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, área de concentração em Sanidade Animal e Saúde Pública, para obtenção do título de mestre.

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa

Orientador

Prof. Dr. Carlos Artur Lopes Leite

Co-orientador

LAVRAS-MG

2022

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo (a) próprio(a) autor(a).

Oliveira, Marina Romano de.

Otite canina em animais de abrigo municipal : etiologia e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos e a óleos essenciais / Marina Romano de Oliveira. - 2022.

71 p. : il.

Orientador(a): Geraldo Márcio da Costa.

Coorientador(a): Carlos Artur Lopes Leite.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2022.

Bibliografia.

1. Otopatias. 2. Resistência. 3. Óleos essenciais. I. Costa, Geraldo Márcio da. II. Leite, Carlos Artur Lopes. III. Título.

MARINA ROMANO DE OLIVEIRA

**OTITE CANINA EM ANIMAIS DE ABRIGO MUNICIPAL: ETIOLOGIA E PERFIL DE
SUSCETIBILIDADE A ANTIMICROBIANOS EA ÓLEOS ESSENCIAIS.**

**CANINE OTITIS IN MUNICIPAL SHELTER ANIMALS: ETIOLOGY AND
SUSCEPTIBILITY PROFILE TO ANTIMICROBIALS AND ESSENTIAL OILS.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do Programa de Pós- Graduação
em Ciências Veterinárias área de concentração em Sanidade
Animal e Saúde Pública, para a obtenção do título de Mestre.

Data de Aprovação: 29 de Abril 2022

Banca Examinadora: Geraldo Márcio da Costa (orientador)
Elizangela Guedes
Juliana Rosa da Silva

Prof. Dr. Geraldo Márcio da Costa
Orientador

LAVRAS-MG
2022

RESUMO

A otite externa canina é uma enfermidade de cunho multifatorial que tem como agentes etiológicos diferentes agentes bacterianos, micóticos e ácaros. Animais de abrigo apresentam maior propensão à enfermidade em função de diferentes fatores de risco que incluem a alta densidade populacional, fatores estressantes que causam imunodebilidade, traumas, dentre outros. A modulação dos fatores de risco e o tratamento constituem as principais ferramentas para o controle da doença. Porém, o uso empírico e indiscriminado de antimicrobianos aceleraram o processo natural de resistência, que vem se tornando um problema de grande preocupação na saúde coletiva, considerando que muitos dos agentes causais da enfermidade apresentam potencial zoonótico, o que demanda a busca por métodos alternativos de tratamento. Devido às suas propriedades antimicrobianas, os óleos essenciais apresentam potencial de uso nestes casos. Neste contexto, os objetivos deste trabalho foram determinar a prevalência da otite em uma população canina de um abrigo coletiva, identificando os agentes envolvidos na etiologia dos casos e avaliar *in vitro* a suscetibilidade dos mesmos aos antibióticos convencionais por meio do teste de difusão em discos e aos óleos essenciais de Capim Limão (*Cymbopogon citratus*), Cravo da Índia (*Eugenia caryophyllata*), Canela Cássia (*Cinnamomum cassia*), Tomilho (*Thymus vulgaris*) e Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), por meio do teste de microdiluição em caldo para determinar a concentração inibitória mínima. O estudo demonstrou alta prevalência de otite canina nos animais do abrigo (90,83%), sendo os principais microrganismos identificados *Malassezia* spp. (90,32%), seguida de *Otodectes cynotis* (33,87%), *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP) (24,19%), do qual foram identificadas a espécie *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus* e outros SCP, e *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN) (14,52%). Os testes de suscetibilidade aos antibióticos convencionais apontaram altas taxas de resistência (38,84%) e a existência de isolados multidroga resistentes. Entre os óleos essenciais testados, Canela Cassia e Tomilho apresentaram a maior ação antimicrobiana, com valores de MIC₅₀ de 3,47 µL/mL e 7,3 µL/mL, respectivamente. Os demais óleos, embora tenham apresentado ação antimicrobiana *in vitro*, exibiram valores mais elevados de CIM₅₀. Níveis mais elevados de resistência foram observados entre os SCP em relação aos SCN, tanto para os antibióticos quanto para os óleos essenciais. De forma geral, nossos resultados apontaram altas taxas de prevalência para a otite na população canina estudada, o que salienta a necessidade de adoção de medidas preventivas para mitigar a enfermidade, e altas taxas de resistência de entre os agentes bacterianos isolados, principalmente *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus* coagulase negativos, frente aos antimicrobianos convencionais, fator de grande preocupação, visto que se trata de agentes com potencial zoonótico e que, portanto, podem ocasionar riscos à saúde pública. Os óleos essenciais de Canela Cássia (*Cinnamomum cassia*) e Tomilho (*Thymus vulgaris*) apresentaram boa eficiência antimicrobiana nos testes *in vitro*, demonstrando ser uma alternativa a ser avaliada *in vivo* para o tratamento da otite canina.

Palavras-chave: Otopatias; *Staphylococcus pseudintermedius*; *Malassezia*; *Otodectes cynotis*; fitoterápicos; óleos essenciais; resistência a antimicrobianos.

ABSTRACT

Canine otitis externa is a multifactorial disease whose etiological agents are different bacterial, mycotic and mites. Shelter animals are more prone to illness due to different risk factors that include high population density, stress factors that cause immunodeficiency, trauma, among others. Modulation of risk factors and treatment are the main tools for disease control. However, the empirical and indiscriminate use of antimicrobials has accelerated the natural process of resistance, which has become a problem of great concern in public health, considering that many of the causal agents of the disease have zoonotic potential, which demands the search for alternative methods of treatment. Treatment. Due to their antimicrobial properties, essential oils have potential for use in these cases. In this context, the objectives of this work were to determine the prevalence of otitis in a canine population of a collective shelter, identifying the agents involved in the etiology of the cases and to evaluate *in vitro* their susceptibility to conventional antibiotics through the disc diffusion test and to essential oils of Lemongrass, Clove of India, *Cinnamon Cassia*, Thyme and Melaleuca, through the broth microdilution test to determine the minimum inhibitory concentration. The study showed a high prevalence of canine otitis in shelter animals (90.83%), WITH *Malassezia* being the main microorganisms identified. spp. (90.32%), followed by *Otodectes cynotis* (33.87%), *Staphylococcus positive coagulase* (SCP) (24.19%), FROM WHICH THE *Staphylococcus* species was identified *pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus* and other SCP, and *Staphylococcus Negative Coagulase* (SCN) (14.52%). Susceptibility tests to conventional antibiotics showed high rates of resistance (38.84%) and the existence of resistant multidrug isolates. Among the essential oils tested, Canela Cassia and Thyme showed the highest antimicrobial action, with MIC₅₀ values of 3.47 µL/mL and 7.3 µL/mL, respectively. The other oils, although they showed antimicrobial action *in vitro*, showed higher values of MIC₅₀. Higher levels of resistance were observed among SCPs than SCNs, both for antibiotics and essential oils. In general, our results showed high prevalence rates for otitis in the studied canine population, which highlights the need to adopt preventive measures to mitigate the disease, and high rates of resistance among isolated bacterial agents, mainly *Staphylococcus pseudintermedius* and *Staphylococcus coagulase negative*, compared to conventional antimicrobials, a factor of great concern, since they are agents with zoonotic potential and that, therefore, can cause risks to public health. Cassia cinnamon and lemongrass essential oils showed good antimicrobial efficiency in *in vitro* tests, *proving to be an alternative to be evaluated in vivo* for the treatment of canine otitis.

Keywords: Otopathies; *Staphylococcus pseudintermedius*; *Malassezia*; *otodectes cynotis*; herbal medicines; essential oils; antimicrobial resistance.

LISTA DE ANEXOS

| | |
|----------------------|----|
| ANEXO 1 | 59 |
| ANEXO 2 | 60 |
| ANEXO 3 | 61 |
| ANEXO 4 | 62 |

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Imagem negativa da eletroforese dos produtos de PCR para identificação de *Staphylococcus pseudintermedius*35
- Figura 2** - Imagem negativa da eletroforese dos produtos de PCR para identificação de *Staphylococcus aureus*35
- Figura 3** - Porcentagem de isolados de *Malassezia* obtidos em ágar Mac Conkey e ágar Sabouraud37
- Figura 4** - Índices de Resistência Total (IRT) e de Múltipla Resistência (IMR) de *Staphylococcus* coagulase positivos (SCP) e *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN) frente antimicrobianos.....42
- Figura 5** - Distribuição de frequências de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos óleos essenciais frente aos patógenos testados.....44
- Figura 6** - Distribuição de frequências de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos óleos essenciais frente aos *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN).....45
- Figura 7** - Distribuição de frequências de Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM) dos óleos essenciais frente aos *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCP).....45
- Figura 8** - Resultados dos testes de Concentrações Inibitórias Mínimas 50 (CIM 50) e Concentrações Inibitórias Mínima 90 (CIM 90) dos óleos essenciais frente aos *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCP) e *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN)46

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1 - Diluições dos óleos essenciais testadas nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM)..... | 31 |
| Tabela 2 - Agentes isolados a partir dos testes microbiológicos..... | 34 |
| Tabela 3 - interpretação de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos convencionais usados nos testes <i>in vitro</i> para <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva utilizando-se o método em disco-difusão em ágar, de acordo com as normas do CLSI (2018)..... | 38 |
| Tabela 4 - Resultados de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos convencionais usados nos testes <i>in vitro</i> frente <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativos, utilizando-se o método em disco-difusão em ágar (CLSI, 2018)..... | 39 |
| Tabela 5 - Resultados de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos convencionais usados nos testes <i>in vitro</i> para <i>Streptococcus</i> spp. pelo método em disco-difusão em ágar (CLSI, 2018)..... | 40 |
| Tabela 6 - Índices de resistência total (IRT) e os índices de múltipla resistência (IMR) por espécies bacterianas isoladas de cães otopatas do abrigo São Francisco, no período de 2021-2022..... | 42 |
| Tabela 7 - A atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos isolados de otite canina, com base nos índices CIM50 e CIM90..... | 44 |
| Tabela 8 - Resultados dos ensaios de concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC) do óleo essencial de melaleuca frente aos isolados de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positivos (SCP) e <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativos (SCN)..... | 47 |
| Tabela 9 - Resultados dos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de tomilho frente aos isolados de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positivos (SCP) e <i>Staphylococcus</i> Coagulas e Negativos (SCN)..... | 48 |
| Tabela 10 - Resultados dos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de Capim Limão frente aos isolados de <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positivos (SCP) e <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativos (SCN)..... | 48 |

Tabela 11 - Resultados dos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de Canela frente aos isolados de *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCP) e *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN).....49

Tabela 12 - Resultados dos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de Cravo frente aos isolados de *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCP) e *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN).....49

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|------------------|--|
| SCP | <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva |
| SCN | <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa |
| STREP | <i>Streptococcus</i> |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| ERI | Eritromicina |
| PEN | Penicilina |
| OXA | Oxacilina |
| MRB | Marbofloxacina |
| RIF | Rifampicina |
| CLO | Cloranfenicol |
| VAN | Vancomicina |
| CLI | Clindamicina |
| CLSI | Clinical & Laboratory Standards Institute |
| PBS1X | 1x Phosphate-Buffered Saline |
| TE buffer | Tris-HCl + EDTA |
| GES | Guanidina + EDTA + Sarcosyl |
| DNA | Ácido Desoxirribonucléico |
| TBE1X | Tris-borato-EDTA |
| RPM | Rotações Por Minuto |
| μL | Microlitros |
| DNTP | Desoxirribonucleotídeos Fosfatados |
| MgCl | Cloreto de Magnésio |
| TAQ | <i>Thermusaquaticus</i> |
| NUC | Gene que codifica a termonuclease de <i>Staphylococcus</i> |
| CIM | Concentração Inibitória Mínima |
| RPMI | Roswell Park Memorial Institute |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO..... | 13 |
| 2.1 Otite canina..... | 13 |
| 2.1.1 Agentes causais da otite canina..... | 13 |
| 2.1.2 Gênero <i>Staphylococcus</i> | 14 |
| 2.1.3 Gênero <i>Proteus</i> | 15 |
| 2.1.4 Gênero <i>Pseudomonas</i> | 15 |
| 2.1.5 Gênero <i>Malassezia</i> | 16 |
| 2.1.6 Gênero <i>Candida</i> | 16 |
| 2.1.7 Gênero <i>Aspergillus</i> | 17 |
| 2.1.8 Gênero <i>Otodectes</i> | 17 |
| 2.2 Diagnóstico de otite externa..... | 18 |
| 2.3 Tratamento da otite canina..... | 19 |
| 2.4 Resistência a antimicrobianos..... | 20 |
| 2.5 Óleos essenciais..... | 21 |
| 2.5.1 Capim-limão (<i>Cymbopogon citratus</i>)..... | 23 |
| 2.5.2 Canela-cássia (<i>Cinnamomum cassia</i>)..... | 23 |
| 2.5.3 Tomilho (<i>Thymus vulgaris</i>)..... | 24 |
| 2.5.4 Cravo-da-índia (<i>Eugenia caryophyllata</i>)..... | 25 |
| 2.5.5 Melaleuca (<i>Melaleuca alternifolia</i>)..... | 26 |
| 3. OBJETIVOS..... | 26 |
| 3.1 Objetivo Geral..... | 26 |
| 3.2 Objetivos específicos..... | 26 |
| 4. MATERIAI E MÉTODOS..... | 27 |
| 4.1 Local de realização do estudo..... | 27 |
| 4.2 Animais utilizados no estudo..... | 27 |
| 4.3 Coleta de exames, citologia e testes laboratoriais..... | 28 |
| 4.4 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos convencionais..... | 29 |
| 4.5 Teste de suscetibilidade aos óleos essenciais..... | 30 |
| 4.6 Identificação molecular dos isolados de <i>Staphylococcus Coagulase Positiva</i> (SCP)..... | 31 |
| 5. HIPÓTESES..... | 33 |
| 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 33 |
| 7. ÓLEOS ESSENCIAIS..... | 43 |
| 8. Conclusões..... | 50 |
| 9. REFERÊNCIAS..... | 50 |
| Anexos..... | 59 |

1. INTRODUÇÃO

A otite, uma das enfermidades mais prevalentes em caninos, é caracterizada por intenso prurido, meneio cefálico, odor fétido e eritema no pavilhão auricular (TEIXEIRA *et al.*, 2019). Esta enfermidade pode ser classificada como externa, média ou interna, dependendo da localidade e das estruturas acometidas (MOREIRA, 2011). Trata-se de uma afecção que tem etiologia multifatorial, geralmente tendo o envolvimento de agentes bacterianos, fúngicos e parasitos.

De uma maneira geral, o tratamento da otite é tópico, exceto em casos mais graves, e varia de acordo com a etiologia do caso. O tipo de agente encontrado nos exames complementares é que vai direcionar o médico veterinário responsável para o melhor antimicrobiano para o caso específico (TEIXEIRA *et al.*, 2019). Como em quase todos os casos se faz o uso de antimicrobianos, é de extrema importância a utilização correta e responsável dos mesmos, tanto para a eficácia do tratamento em si como para minimizar as implicações relacionadas com a resistência na saúde coletiva. Quando usados de maneira indiscriminada, sem controle e sem indicação correta, esses fármacos aceleram o processo de resistência antimicrobiana. A resistência bacteriana é uma preocupação cada vez maior na área da saúde, pois mesma está ocorrendo de maneira muito mais acelerada do que a descoberta e desenvolvimento de novos antimicrobianos (HECK, 2007). O fenômeno é agravado não somente pelo uso indiscriminado na medicina humana, mas também pela falta de controle de utilização destes fármacos na medicina veterinária, uma vez que somente agora legislações que regulamentam o uso dos mesmos estão em vigor e, até então, é comum o uso indiscriminado de antimicrobianos. Uma das formas de promover a desaceleração do processo de resistência é através da realização de exames complementares e testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, pois são de grande importância para se identificar o medicamento adequado para cada microrganismo e monitorar a resistência a esses fármacos. Outra forma de se mitigar o problema da resistência aos antimicrobianos é a busca por fármacos alternativos. Nesta linha, podem ser relacionados os óleos essenciais (FERREIRA; PINTO, 2010), uma vez que diversos estudos destacam, dentre outras características, suas propriedades antimicrobianas. O uso de óleos essenciais como forma de tratamento alternativa poderia, portanto, auxiliar na cura de algumas infecções, evitando o uso de antimicrobianos clássicos e retardando, desta forma, o problema da resistência.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Otite canina

A otite canina é um processo inflamatório de casuística significativa na clínica de pequenos animais, representando cerca de 10 a 20% dos casos de atendimentos na clínica ambulatorial (KORBELIK *et al.*, 2018). Trata-se de uma enfermidade que se caracteriza por dor, prurido intenso, secreção no pavilhão auricular, odor fétido, eritema e meneio cefálico (TEIXEIRA *et al.*, 2019). Esta enfermidade é de caráter geralmente agudo, porém se não tratada adequadamente, pode evoluir para cronicidade, atingindo estruturas mais profundas do conduto auditivo, evoluindo para otite média ou até mesmo interna, podendo desencadear sinais neurológicos (MOREIRA, 2011).

A otite é ocasionada por fatores que irritam as estruturas auriculares, sendo estes classificados em predisponentes primários, secundários ou persistentes (HOSSEINI, 2012). Alguns autores, como Korbelick (2018) e Jacobson (2002) incluem os fatores predisponentes como causa primária. Como fatores predisponentes ou primários podem ser citados a raça, orelhas pendulares, umidade excessiva, produção excessiva de cerúmen, pelos dentro do pavilhão auditivo, estruturas auriculares estreitas, corpos estranhos, parasitas como a sarna otodécica e doenças como a dermatite tópica ou hipersensibilidade alimentar (JACOBSON, 2002). Estes fatores proporcionam um ambiente propício para proliferação microbiana, tanto fúngica quanto bacteriana. Esses patógenos podem ser componentes da própria microbiota e são responsáveis pela evolução do processo que pode ser primariamente inflamatório, evoluindo para infeccioso (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

A otite canina é, portanto, de etiologia multifatorial, tendo o envolvimento de agentes microbianos, como bactérias, fungos e parasitos.

2.1.1 Agentes causais da otite canina

Os agentes bacterianos, micóticos e parasitários mais comumente envolvidos na etiologia da otite canina são encontrados em âmbito mundial. Entre os agentes bacterianos, destacam-se *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Proteus* spp. e *Pseudomonas aeruginosa* (OLIVEIRA, *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2019). Entre os agentes fúngicos, destacam-se *Malassezia paquidermatis*, *Aspergillus* spp. e *Candida albicans*. Quanto aos parasitos, o

principal é o ácaro *Otodectes cynotis*, agente causador da sarna otodécica (ARTHER *et al.*, 2015; POSSEBON; KAISER; MARTINS, 2015).

2.1.2 Gênero *Staphylococcus*

O gênero *Staphylococcus* é composto por mais de 50 espécies, das quais algumas tem sido mais associadas com as infecções otológicas em caninos, incluindo *S. pseudintermedius*, *S. aureus* e *S. epidermidis*. *S. aureus* de maior importância, capaz de causar não somente a otite, mas também infecções como as dermatite e a mastite (ROSSI; PEREIRA; GIAMBIAGI-DEMARVAL, 2020).

Staphylococcus são bactérias Gram-positivas com morfologia de cocos em cachos (organizados como “cachos de uva”) que apresentam metabolismo aeróbico ou anaeróbico facultativo (QUINN *et al.*, 2005). Podem ser classificadas em espécies coagulase positiva e negativa, de acordo com a capacidade de produzir a enzima coagulase, responsável pela formação de coágulos sanguíneos (ROSSI; PEREIRA; GIAMBIAGI-DEMARVAL, 2020). *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudintermedius* são as principais espécies deste gênero envolvidas em afecções dérmicas de caninos (SANTOS, 2019).

Staphylococcus aureus é um agente oportunista comumente encontrado na microbiota da pele e mucosas de animais e de seres humanos, sendo um agente oportunista responsável por infecções como furúnculos, celulite e pneumonia. Este agente está também envolvido em endocardite infecciosa, sepsis e choque tóxico. Dentre os fatores de virulência esta espécie, destacam-se os superantígenos estafilocócicos e a capacidade de formação de biofilmes (LOPES, 2018; TAYLOR, 2020).

Staphylococcus pseudintermedius, por sua vez, é o agente predominante na otite canina, tendo também marcante participação nas infecções de pele em cães (TRIANI, 2019). Além de ampla atuação nos processos infecciosos, as bactérias do gênero *Staphylococcus* vem demonstrando cada vez mais resistência aos antimicrobianos, como é o caso de *Staphylococcus aureus* resistentes à metilicilina (MRSA), agente de importância na saúde coletiva em âmbito mundial. Estes microrganismos geralmente apresentam taxas elevadas de resistência, principalmente aos antibióticos betalactâmicos, sendo susceptíveis apenas aos antimicrobianos glicopeptídicos, como a vancomicina e a substâncias experimentais (ENRIGHT *et al.*, 2002).

2.1.3 Gênero *Proteus*

As bactérias do gênero *Proteus* pertencem à família Enterobacteraceae e, sendo as espécies divididas em *Proteus mirabilis*, *Proteus penneri*, *Proteus vulgaris* e *Proteus hauseri*, destacando-se *P. mirabilis* e *P. vulgaris* no que se refere ao envolvimento em processos infecciosos (DRZEWIECKA, 2016). Estes microrganismos se caracterizam como bastonetes Gram negativos que apresentam um mecanismo de deslocamento ímpar, chamado de “mecanismo de enxame” (SCHAFFER; PEARSON, 2017). Esse mecanismo atua na morfologia da bactéria. Quando este agente está em meio líquido, apresenta flagelos, facilitando dessa forma sua locomoção. Porém, em meio sólido, esses flagelos tornam-se ineficazes para o deslocamento, e então é ativado o mecanismo de enxame, que nada mais é que a sinalização entre células para diferenciação de sua morfologia, saindo da forma de bastonetes curtos e com poucos flagelos para células alongadas e hiperflageladas, as quais por meio dessa comunicação conseguem se deslocar para fora do ponto de inoculação. Esse fenômeno, portanto, deixa marcas características nas placas de meio de cultura, que são os anéis (KWIL *et al.*, 2013).

Além do mecanismo de enxame, essas bactérias possuem a capacidade de produção de uréase, a qual hidrolisa a ureia, formando amônia e dióxido de carbono, alcalinizando o meio. Produz também sulfeto de hidrogênio e em testes laboratoriais mostram-se lactose e indol-negativos (SCHAFFER; PEARSON, 2017).

Apesar de estar presente de forma natural no organismo de animais domésticos e selvagens, *Proteus* pode ter envolvimento no processo de otite canina (principalmente *Proteus mirabilis*), além de infecções urinárias em seres humanos e em caninos (ZAPPA, 2015). As bactérias deste gênero são consideradas agentes oportunistas, uma vez que causam infecção/doença apenas em hospedeiros que apresentem queda de imunidade (SONGER; POST; 2005; MURRAY *et al.*, 2007). Outra característica importante das bactérias deste gênero é sua proliferação em matéria orgânica em decomposição (DRZEWIECKA, 2016).

2.1.4 Gênero *Pseudomonas*

Pseudomonas é uma bactéria Gram negativa com aspecto morfológico de bastonete que apresenta metabolismo aeróbico. Este agente geralmente causa infecções nosocomiais em indivíduos imunocomprometidos, estando associado a ferimentos cutâneos e queimaduras, ao uso contínuo de medicação intravenosa, transplantes de órgãos, fibrose cística e leucemia aguda (OCHOA, 2013).

O gênero *Pseudomonas* apresenta uma gama de espécies, das quais destacam-se *P. aeruginosa*, *P. alcaligenes*, *P. fluorescens*, *P. chlororaphis*, *P. ovalis* e *P. putida*. Podem apresentar diferentes tipos de características, como acúmulo de grânulos de poli- β -hidroxibutirato dentro da célula (PHB) em ambientes com baixa concentração de nitrogênio, ou polihidroxialcanoatos em fontes de carbono (PHA), além de presença de flagelos e pili em algumas espécies (PALLERONI; NORTH CALDWELL, 2015).

A espécie *Pseudomonas aeruginosa* tem sido associada a quadros de septicemia, otite externa, meningite, endoftalmite e também pneumonia (LIMA *et al.*, 2016; OCHOA, 2013). Além disso, é uma bactéria com alta resistência a antimicrobianos, por produzir enzimas beta-lactamases e metalo-beta-lactamases que desencadeiam multirresistência às drogas (FIGUEIREDO, 2007).

2.1.5 Gênero *Malassezia*

Malassezia é um gênero de leveduras da classe dos basidiomicetos que se caracterizam por um formato oval, conhecido por forma de “chinelinho”. Estas leveduras são lipofílicas, utilizando-se da gordura presente na pele como substrato, o que determina o aspecto engordurado nos sítios de infecção onde estão presentes (THEELEN *et al.*, 2018).

Uma vez que pertence à microbiota epidérmica natural, este agente tem caráter oportunista, estando associado a infecções em indivíduos imunossuprimidos (CHANUSSOT; ARENAS, 2006). Encontrando condições para se multiplicar, o agente pode causar doenças dermatológicas como a pitíriase versicolor, conhecida como “pano branco”, foliculite, dermatite atópica, caspa e psoríase em humanos, e a otite e dermatite seborréica ou caspa em animais (THEELEN *et al.*, 2018).

Atualmente, são conhecidas 17 espécies de *Malassezia*, das quais a *Malassezia pachydermatis* é a mais frequentemente envolvida na etiologia da otite externa canina (BISMARCK *et al.*, 2020). Além do envolvimento na otite, *Malassezia pachydermatis* está frequentemente associada com quadros de micose cutânea, uma das doenças fúngicas mais frequentes em cães (MACHADO *et al.*, 2004).

2.1.6 Gênero *Candida*

O gênero *Candida* é caracterizado por morfologia dimórfica que, dependendo das condições de cultivo, podem se apresentar na forma de hifas ou de leveduras, as quais são visualizadas ao microscópio, pelas colorações de Gram ou Giemsa (SERRACARBASSA; DOTTO,

2003), por panótico rápido (RAMOS *et al.*, 2017) e coloração de azul de algodão (MENEZES; CUNHA; CUNHA, 2012).

O gênero é composto por diferentes espécies como *C. guilliermondii*, *C. tropicallis*, *C. krusei*, *C. stellatoidea*, *C. parapsilosis* e *C. albicans*, sendo que esta última espécie ocupa maior destaque (LIMA *et al.*, 2006). As principais espécies presentes nos quadros de otite externa em cães são *C. tropicallis*, *C. parapsilosis* e *C. albicans* (EBANI *et al.*, 2017).

Assim como *Malassezia*, os fungos do gênero *Candida* pertencem à microbiota natural da pele e mucosas (SILVA; DÍAZ; FEBRÉ, 2002), apresentando um caráter oportunista típico das leveduras, que desencadeia quadros clínicos quando seu hospedeiro demonstra queda de imunidade, tal como ocorre, por exemplo, na candidíase e em seres humanos (CASTRO *et al.*, 2006).

2.1.7 Gênero *Aspergillus*

Aspergillus são fungos saprófitos, ou seja, obtêm seus nutrientes a partir de matéria orgânica morta ou em decomposição, sendo encontrados principalmente no solo e em detritos orgânicos. Multiplicam-se por meio de conídios que se dispersam no ambiente e podem causar infecções oportunistas na superfície da pele de indivíduos imunocomprometidos (COYNER, 2010).

Estes fungos têm envolvimento em processos alérgicos, quadros respiratórios e em uma série de transplantes, como os de células-tronco hematopoiéticas, tendo destaque as espécies *A. terreus*, *A. fumigatus*, *A. flavus* e *A. niger* (SINGH; PATERSON, 2005). No caso dos cães, estes fungos geralmente provocam otite unilateral, sendo *Aspergillus niger* e *Aspergillus terreus* espécies mais comuns nesse tipo de afecção (GOODALE; OUTERBRIDGE; WHITE, 2016).

2.1.8 Gênero *Otodectes*

Diversos estudos apontam o envolvimento do ácaro da espécie *Otodectes cynotis* na otite canina (SOTIRAKI *et al.*, 2001). Este agente pertence à família Psoroptidae, é classificado como um ácaro não penetrante (DIENSTMANN, 2010) e tem participação em cerca de 50% dos casos de otite externa.

Trata-se de um patógeno que possui distribuição mundial, podendo ser encontrado em qualquer lugar do globo. Este se alimenta dos detritos epidérmicos, se instalando na região mais superficial da pele e acumulando, dessa forma, cerúmen semelhante a borra de café (ARTHER *et al.*, 2015).

Este ácaro acomete principalmente animais mais jovens e atua como fator predisponente para infecções secundárias. Estas, quando ocorrem, podem levar ao rompimento da membrana timpânica e agravamento para otite média, principalmente quando do envolvimento de bactérias Gram positivas (FARKAS, 2007).

Para diagnóstico de uma otite causada por *Otodectes*, alguns autores sugerem maior eficácia diagnóstica através de lavagem do pavilhão auditivo com óleo mineral e coleta deste conteúdo, pois, Segundo Sotiraki *et al.* (2001), a coleta de amostras por meio de sua besotológicos pode não detectar o agente nos casos em que houver pequena carga do mesmo.

2.2 Diagnóstico de otite externa

O diagnóstico de otite é baseado no histórico do animal, levando em consideração sintomas como prurido, odor, balançar a cabeça (meneio cefálico), dor, cabeça “tombada”, esfregar face no chão e até vocalização, exame físico, que envolve a inspeção com ajuda de um otoscópio, o qual avalia presença de inflamação, cerúmen, corpos estranhos ou até exsudato no canal auditivo e a membrana timpânica (se esta está inflamada, rompida ou intacta), e por fim, a realização de exames complementares (LECCHI *et al.*, 2020).

No que se refere aos exames complementares, há uma série de recursos, dos quais destacam-se a própria otoscopia, a radiografia, miringotomia, citologia e culturas fúngicas e bacterianas (KENNIS, 2013; LECCHI *et al.*, 2020).

O exame de otoscopia consiste na visualização do conduto auditivo através do otoscópio ou de uma micro câmera (processo chamado vídeo-otoscopia), a qual permite observar a presença ou não de exsudatos e também avaliar a integridade da membrana timpânica. Esta técnica auxilia também na observação de ácaros (KENNIS, 2013).

Já a radiografia é um procedimento que permite avaliar por meio de imagens a bula timpânica, permitindo observar também se há conteúdo no tímpano, acometimento de estruturas ósseas e/ou estruturas inflamadas. Ajuda também a diagnosticar presença de possíveis tumores (GOTTHELF, 2004).

A miringotomia, por sua vez, é um procedimento no qual é feita uma incisão na membrana timpânica com a finalidade de se drenar conteúdos que possam estar causando inflamação ou até mesmo pus derivado de uma otite média (SPSP, 2013). É importante para se avaliar a possibilidade do agravamento do caso. O procedimento é feito com o animal anestesiado, agulha própria para incisão e catéter para sucção do conteúdo e pode ocasionar

alívio imediato da dor, caso haja comprometimento das estruturas do ouvido médio (GOTTHELF, 2004; SPSP, 2013).

Segundo Murphy (2001), um procedimento essencial para o diagnóstico da otite é a citologia. O exame citológico é um dos métodos mais fáceis para se identificar os agentes infecciosos envolvidos na enfermidade do indivíduo, podendo ser feito rapidamente pelo clínico e evitando erros no diagnóstico e tratamento, que podem desenvolver uma resistência aos antimicrobianos e tornar o processo crônico (ANGUS, 2004). Consiste na coleta do conteúdo presente no pavilhão auditivo do paciente com um suabe estéril, o qual é rolado numa lâmina de vidro e em seguida fixada em fogo e corada, geralmente por panótico rápido (TEIXEIRA *et al.*, 2019). Depois de seca, a lâmina é analisada no microscópio, permitindo a visualização e identificação dos agentes presentes no conteúdo.

Por fim, outro método diagnóstico muito usado é a cultura. Segundo (MADIGAN *et al.*, 2016) o meio de cultura é uma solução rica em nutrientes que proporciona um ambiente favorável para o crescimento de microrganismos. A partir desse crescimento é possível realizar o isolamento do (s) agente (s) e estudá-lo (s) de forma mais detalhada em laboratório. Existem vários tipos de meio de cultura, os quais apresentam diferenças na composição e proporção de nutrientes, podendo, dessa forma, inibirem ou proporcionarem o crescimento de determinados microrganismos, caso estejam presentes na amostra em questão. De forma geral, o exame consiste na deposição da amostra no meio de cultura, seja por meio de estrias. Após essa deposição o meio fica em incubação por períodos de tempo e temperatura de acordo com as características do agente de suspeita do caso.

O meio mais utilizado para o isolamento de fungos é o Agar Sabouraud, e o ágar Sangue e ágar Mac Conkey para o isolamento bacteriano. Após o isolamento do agente, pode ser feito o teste de suscetibilidade a antimicrobianos, para um melhor direcionamento do tratamento (QUINN *et al.*, 2005).

2.3 Tratamento da otite canina

O protocolo tradicional usado para o tratamento de otite é predominantemente tópico, constituído pela limpeza auricular com ceruminolítico e aplicação de medicamentos tópicos que contenham anti-inflamatórios e antimicrobianos (TEIXEIRA *et al.*, 2019). As classes de antibióticos mais usadas nesse tipo de afecção são aminoglicosídeos, quinolonas, polimixina B e cloranfenicol (MUELLER, 2009). No grupo dos aminoglicosídeos destacam-se a gentamicina, a

neomicina e a tobramicina; e no das quinolonas tem destaque a enrofloxacina (OLIVEIRA *et al.*, 2005).

Quando há o envolvimento de fungos na etiologia da afecção, o cetoconazol é a droga mais utilizada (CASTRO *et al.*, 2006). Há protocolo sem que se utiliza o itraconazol associado a lavagens auriculares com soro estéril e miconazol tópico (GHIBAUDO, 2010).

No caso de otites causadas por *Otodectes cynotis* o tratamento indicado geralmente é sistêmico, sendo os mais indicados a ivermectina, na sua forma oral ou subcutânea (na dosagem de 0,03 mg por kg), ou ectoparasiticidasspot-on, como a selamectina, a combinação de imidaclopride e moxidectina, ou também isoxazolina, que tem demonstrado boa eficiência (SHANKS *et al.*, 2000; SIX *et al.*, 2000; FOURIE *et al.*, 2003; NOLAN; LOK, 2012; YANG; HUANG, 2016). Em casos de cronicidade onde há otite média ou casos que o tratamento não é responsivo, indica-se intervenção cirúrgica ao paciente (TER HAAR, 2014). Dentre os procedimentos cirúrgicos mais comuns, destacam-se a ressecção da parede lateral do canal auditivo e ablação completa do canal ou apenas de sua parte superior (DOYLE *et al.*, 2004).

Métodos alternativos para o tratamento das otites têm sido cada vez mais importantes devido ao problema de resistência a antimicrobianos. Dentre estes métodos, destacam-se a ozonoterapia, que vêm trazendo resultados positivos (FRITZEN; TORTELLY; VONSOWSKI, 2018) e também o uso de óleos essenciais. Freitas (2019) mostrou a eficácia do óleo essencial de Cravo da Índia em *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes e sensíveis à metilicina e Neves *et al.* (2013) demonstraram que o óleo de Melaleuca apresentou eficácia *in vitro* contra *Otodectes cynotis*.

2.4 Resistência a antimicrobianos

A resistência aos antimicrobianos é um fenômeno crescente entre os agentes bacterianos envolvidos em afecções em seres humanos e animais. Na medicina veterinária, o fenômeno tem sido relatado entre patógenos causadores de mastite em ruminantes (COSTA *et al.*, 2013), enteropatógenos de suínos como *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* (SILVA, SANTOS, SCHMIDT, 2008), infecções otológicas em caninos (ISHII; FREITAS; ARIAS, 2011), dentre outras afecções. Fatores como o uso indiscriminado de antibióticos, erros em protocolos terapêuticos e o uso de antimicrobianos como promotores de crescimento têm contribuído para o agravamento do problema.

Os mecanismos mais comuns de desenvolvimento de resistência incluem as mutações, plasmídeos de resistência, bombas de efluxo multidrogas e a resistência adaptativa (BECERRA *et al.*, 2009). O incremento da resistência está relacionado com o fato de os determinantes genéticos de resistência geralmente estarem presentes em elementos genéticos móveis (plasmídeos, transposons, ilhas de patogenicidade, bacteriófagos) que podem ser transferidos de uma bactéria para outra, principalmente pelos fenômenos de conjugação e transdução (FROST *et al.*, 2005; SNYDER; CHAMPNESS, 2007).

Para a espécie *Staphylococcus pseudintermedius* a baixa suscetibilidade aos antimicrobianos é uma realidade preocupante, uma vez que já foi constatada resistência à meticilina em amostras de otite externa em cães (DZIVA, 2015). Petrov (2013) demonstrou a resistência de *Staphylococcus* spp. frente ao cloranfenicol e de *Streptococcus* à enrofloxacina e à polimixina B. *Pseudomonas aeruginosa*, outro agente importante na otite externa, foi classificada com resistente para fluoroquinolonas (HOSSEINI, 2012).

O fenômeno da resistência ocorre de forma muito mais acelerada que a produção de novos compostos antimicrobianos. Tal fato gera grande preocupação, uma vez que pode se atingir um patamar no qual não haja mais medicamentos eficazes e nem novos fármacos disponíveis (HECK, 2007). Com a aceleração da resistência aos antimicrobianos, torna-se necessária a busca por terapias alternativas. Uma das alternativas bastante estudadas é o uso de óleos essenciais.

2.5 Óleos essenciais

Óleos essenciais são substâncias que têm como base matéria prima vegetal (NAZARETH, 2012), podendo ser extraídos de folhas, sementes, cascas, flores e frutos. São utilizados na culinária, produção de cosméticos e também de medicamentos fitoterápicos (FERREIRA; PINTO, 2010). Apresentam uma composição muito complexa, sendo constituídos por dezenas ou até centenas de diferentes compostos ativos. Esta vasta composição confere aos mesmos propriedades terapêuticas fitoterápicas, bacteriostáticas, antibióticas, antifúngicas, antivirais e nutricionais, sendo que as ações bacteriostáticas e antibióticas ocorrem por ação de compostos terpenóides, ou seja, compostos com diversas classes de substâncias naturais (BURT, 2004).

Devido sua alta complexidade, os patógenos geralmente levam muito mais tempo para desenvolver resistência aos óleos essenciais, comparativamente aos antibióticos convencionais, o que endossa os estudos visando utilizá-los como medicamentos alternativos no tratamento de infecções (ARAÚJO, 2015).

Alguns óleos são comprovadamente eficazes para o controle de infecções. Por terem propriedades lipofílicas, são capazes de atravessar a membrana citoplasmática do agente, provocando um desequilíbrio hidroeletrolítico em membranas hidrossolúveis (CAVALCANTI, 2011). Pode ocorrer também o aumento da permeabilidade da membrana bacteriana através de princípios ativos como o timol e o carvacrol (LAMBERT *et al.*, 2001), o que permite maior entrada de ATP, desencadeando a quelação de cátions (DI PASQUA *et al.*, 2006), e outros mecanismos como a chamada força próton-motriz, que provoca a desintegração de membrana, coagulação do conteúdo celular, transporte ativo e até fluxo de elétrons (BURT, 2004).

Diversos estudos focando o uso de óleos essenciais como forma alternativa para tratamento de processos infecciosos têm demonstrado resultados promissores, como por exemplo os estudos de Dal Pozzo *et al.* (2011) que utilizaram os óleos essenciais de *Lippia graveolens*, *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, *Salvia officinalis*, *Zingiber officinale*, *Rosmarinus officinalis* e *Ocimum basilicum* no tratamento de mastite em caprinos. Além deste estudo, podem ser citados: Silvestri *et al.* (2010) que avaliaram a atividade antibacteriana de antioxidante do óleo essencial de *Eugenia caryophyllata*; Freire *et al.* (2014) estudaram a eficácia de *Ocimum basilicum*, *Thymus vulgaris* e *Cinnamomum cassia* contra *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*; Perini *et al.* (2013) que avaliaram a ação antimicrobiana os óleos essenciais de *Salvias clarea*, *Elettaria cardomomun*, *Eugenia caryophyllata*, *Rosmarinus officinalis*, *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon winterianus*, *Cymbopogon flexoususe Cinnamomum cassia* contra *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina. Ainda nesta mesma linha, Sousa *et al.* (2021) relataram propriedades antifúngicas de *Cinnamomum verum*, *Schinus terebinthifolius Raddi*, *Rosmarinus officinalis* e *Cympopogon citratus* e Neves *et al.* (2013) avaliaram *in vitro* o óleo de *Melaleuca alternifolia* contra *Otodectes cynotis*. Embora amplamente testados em diferentes afecções, o número de estudos de tratamentos alternativos na medicina veterinária ainda é pequeno (FRITZEN; TORTELLY; VONSOWSKI, 2018).

De acordo com os estudos supra-relacionados, alguns dos principais óleos essenciais que têm demonstrado propriedades antimicrobianas são o óleo de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), canela-cássia (*Cinnamomum cassia*), tomilho (*Thymus vulgaris*), cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*) e melaleuca (*Melaleuca alternifolia*).

2.5.1 Capim-limão (*Cymbopogon citratus*)

O Capim-limão é uma erva aromática perene da família *Poaceae* originária da Índia. É comumente encontrado nas regiões tropicais do globo, com destaque para a Índia, Indonésia e Brasil, onde é reconhecido por diversos sinônimos como Capim-limão, Capim-cidreira, Capim-santo, Erva-cidreira, entre outros (BAUDOUX, 2017). A parte da planta a ser destilada para a produção do óleo essencial são as folhas, as quais possuem células parenquimáticas diferenciadas onde são armazenados os componentes químicos aromáticos a serem extraídos (COSTA *et al.*, 2005).

O óleo essencial de Capim-limão é composto em sua grande maioria pelo aldeído terpênico citral (60-85%), um isômero constituído por geranial e neral, que confere as características antimicrobianas principais do óleo, sendo caracterizado como um anti-infeccioso de espectro estreito (LIMA *et al.*, 2008; BAUDOUX, 2017). O óleo também apresenta propriedades calmantes, sedativas, analgésicas, digestivas e até mesmo antitumorais, além de ser um ótimo repelente, antirreumático e antifebril (MANVITHA; BIDYA, 2014). Sua ação antifúngica também foi relatada, sendo observada atividade de amplo espectro contra *Candida* spp. (SILVA *et al.*, 2008).

No que se refere à atividade antimicrobiana, o citral irá atuar diretamente na membrana celular do agente patológico inibindo suas enzimas e incapacitando o seu desenvolvimento, pois têm propriedades lipofílicas que acabam se unindo aos lipopolissacarídeos da célula bacteriana, provocando a instabilidade estrutural no agente (OLIVEIRA, 2011). Devido a essa característica, o óleo essencial de Capim-limão se mostra mais eficaz contra bactérias Gram positivas, já que estas apresentam membrana celular externa. Todavia, o efeito antibacteriano é variável entre as espécies microbianas, podendo apresentar efeito bacteriostático ou bactericida de acordo com cada espécie (MACHADO *et al.*, 2015).

2.5.2 Canela-cássia (*Cinnamomum cassia*)

Originária do sul da China e do Vietnã, a Canela-cássia ou Canela-da-China é uma árvore de folhagem perene que cresce em lugares de clima tropical. Suas flores são amarelas e seus frutos se assemelham aos do cravo-da-índia. Pertencente à família *Lauraceae*, é a espécie mais difundida e consumida no mundo (RAVINDRAN *et al.*, 2004). A casca externa do seu tronco é rugosa e castanho-acinzentada, enquanto a parte interna é lisa e castanho-avermelhada. Para seu uso como especiaria são utilizadas, principalmente, as cascas dos galhos que são colhidas na estação das chuvas e colocadas para a secagem durante a época da seca. Quando secas, as cascas se enrolam sobre si formando canudos que serão classificados pelo seu comprimento, cheiro e

cor. Para a obtenção do óleo essencial são utilizados os galhos da árvore, que incluem o talo, a casca e as folhas. (VASCONCELOS, 2018).

O principal composto do óleo essencial de Canela-Cassia é o aldeído aromático cinamaldeído (75-80%), ele apresenta forte ação antimicrobiana de largo espectro de ação, além de apresentar propriedades antivirótica, antifúngica, antiparasitária, termogênica e antiglicêmica (BAUDOUX, 2017). O cinamaldeído atua ligando-se à parte lipídica da membrana celular bacteriana desestruturando-a e assim a inativando (DI PASQUA *et al.*, 2006; BANSODE, 2012). FREIRE *et al.* (2014) relataram também ação da *Cinnamomum cássia* sobre fungos, como a *Candida albicans*.

2.5.3 Tomilho (*Thymus vulgaris*)

O Tomilho é um subarbusto perene da família *Lamiaceae*, de origem europeia, famosa por ser usada como planta medicinal. É ramificado, de porte ereto, alcançando de 20 a 30cm de altura. Possui folhas simples, pequenas, verdes escuras e ovais (ROCHA, 2013). Seu óleo essencial é obtido através das sumidades floridas da planta, sendo suas características florais variáveis entre os quimiotipos.

O Tomilho apresenta propriedades antimicrobianas, antissépticas e até repelentes, além de ser antioxidante, expectorante, adstringente e estimulante digestivo (LORENZINI; MATOS, 2002) devido aos seus compostos ativos carvacrol e timol, de origem fenólica (CASTRO *et al.*, 2007).

Os compostos ativos apresentam extremidade hidrofóbica. Isso permite alterações na permeabilidade de cátions na membrana da bactéria, como potássio e hidrogênio, desestabilizando-a (NAZARETH, 2012).

Thymus vulgaris pode apresentar variações em seus componentes aromáticos de acordo com a altitude em que for cultivado. Essa variação recebe o nome de quimiotipo e é essencial seu conhecimento para a identificação correta da composição bioquímica do óleo essencial a ser produzido. O Tomilho possui um grande número de quimiotipos, entre eles destacam-se: *T. vulgaris* q t geraniol, *T. vulgaris* q t linalol, *T. vulgaris* q t timol, *T. vulgaris* q t carvacrol e *T. vulgaris* q t tuianol. O quimiotipo carvacrol é mais encontrado nos garrigues secos europeus de altitude próxima ao mar. Já os tomilhos encontrados nos planaltos de 400 a 600 metros de altitude correspondem ao quimiotipo timol, embora frequentemente se encontrem misturados com o carvacrol das planícies. Os quimio tipos linalol e tuianol são encontrados em altitudes médias de 500 a 1,3 mil metros, devido a isso são mais cultivados na região terço sul da França (BAUDOUX, 2017).

Em relação ao óleo essencial de Tomilho q t timol, destaca-se em sua composição dois fenóis aromáticos: o timol e o carvacrol que constituem cerca de 50% da bioquímica do óleo. Esses fenóis são caracterizados como anti-infecciosos potentes com largo espectro de ação, o que trará ao óleo as características antibacterianas, antiviróticas, antifúngicas, antiparasitárias e antissépticas. Além disso, o óleo irá atuar como repelente, antioxidante, expectorante, adstringente e estimulante digestivo (LORENZINI; MATOS, 2002). Os compostos ativos do óleo apresentam extremidade hidrofóbica. Isso permite alterações na permeabilidade de cátions na membrana da bactéria, como potássio e hidrogênio, desestabilizando-a (NAZARETH, 2012).

2.5.4 Cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*)

O Cravo-da-Índia é uma árvore perene, de formato piramidal, alcançando de 10 à 15 metros de altura, pertencente à família Myrtaceae. Originário das Ilhas Molucas, tem predição por ambientes de climas quentes e úmidos, por isso é encontrado em sua maior parte na Indonésia, em Madagascar e em Zanzibar (BAUDOUX, 2017). Sua parte mais utilizada para produção de óleos essenciais são seus botões de flores secos, tendo como composto principal o eugenol, o qual é rico em propriedades antissépticas, bactericidas, antifúngicas, anestésicas, anti-inflamatórias e analgésicas, sendo essas três últimas características importantes para seu uso na odontologia. Apresenta também bons resultados quando usado para tratar náuseas, diarreias, indigestões e até flatulências (KUETE, 2017).

Para seu emprego comercial são utilizados os botões florais verdes crescidos e secos, utilizados principalmente como condimento devido ao seu sabor marcante. Além disso, atuam como planta medicinal promovendo ação expectorante, antiemética, e estimulante antigases para o tratamento da dispepsia. Por meio dos botões florais secos também pode ser obtido o óleo essencial de cravo-da-índia, através do processo de hidro-destilação (RAINA *et al.*, 2001).

O fenol eugenol é o composto químico de maior abundância no óleo essencial de Cravo-da-índia (70-80%), o que irá caracterizá-lo como um potente anti-infeccioso de largo espectro de ação, atuando contra vírus, bactérias fungos e parasitas (BAUDOUX, 2017). O óleo também possui propriedades anestésicas, anti-inflamatórias e analgésicas, características importantes que justificam seu uso na odontologia. Apresenta também bons resultados quando usado para o tratamento de náuseas, diarreias, indigestões e flatulências (KUETE, 2017).

Quanto a sua capacidade antifúngica, demonstrou um ótimo desempenho sendo eficiente no combate da *Candida* e de outros fungos que acometem seres humanos. Como antibacteriano

demonstrou ação eficaz contra *Escherichia coli*, porém sua ação antimicrobiana foi demonstrada de maneira mais eficiente na conservação de alimentos (SILVESTRI *et al.*, 2010).

2.5.5 Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*)

A Melaleuca, também conhecida como *Tea Tree*, é um arbusto originário da Austrália e é encontrada em regiões pantanosas, de solo úmido, próximas a rios. Assim como o cravo-da-índia, faz parte da família Myrtaceae, embora tenha um porte menor, alcançando até 5 metros de altura. Possui uma casca fina que cai em retalhos, característica comum às Mirtáceas. Suas folhas são estreitas e lanceoladas, e em sua superfície é possível visualizar um pontilhado de glândulas secretoras, por onde é extraído o óleo essencial de melaleuca (SILVA *et al.*, 2008).

Em relação a sua composição química, o óleo é composto majoritariamente pelos álcoois terpênicos: teroinen-4-ol e α -terpineol, que constituem 30 a 50%. O restante do óleo é composto pelos terpenos: p-cimeno, terpinenos e terpinoleno (30%); pelos sesquiterpenos: aromadendreno e cadineno (5%); e pelo óxido terpênico 1,8-cineol (5-10%). Devido a essa bioquímica, é considerado um anti-infeccioso de largo espectro de ação, com forte capacidade antibacteriana, antifúngica e antiviral, além de atuar como anti-inflamatório (BAUDOUX, 2017).

Como antifúngico, foi observado efeito do óleo essencial de *Melaleuca aleternifolia* contra biofilmes em formação e maduros de *C. albicans* (OLIVEIRA, 2019). Também apresentou efeito bacteriostático e bactericida contra cepas de *S. aureus* resistentes à penicilina G (FINHLER *et al.*, 2020). Seu uso como acaricida também vem sendo estudado. Neves *et al.* (2012) constatou o efeito acaricida no uso *in vivo*, do óleo essencial de melaleuca em uma formulação a 5% contra *Otodectes cynotis*.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a capacidade antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), canela-cássia (*Cinnamomum cassia*), tomilho (*Thymus vulgaris*), cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*) e melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) contra os principais agentes microbianos causadores de otite externa canina.

3.2 Objetivos Específicos:

I - Avaliar a prevalência da otite canina em animais do abrigo Francisco de Assis, Lavras/MG.

II- Determinar a etiologia das infecções otológicas dos caninos do abrigo São Francisco.

III- Avaliar *in vitro* a suscetibilidade dos patógenos bacterianos causadores de otite nos animais do Abrigo Municipal aos antibióticos convencionais e aos óleos essenciais de capim-limão (*Cymbopogon citratus*), canela-cássia (*Cinnamomum cassia*), tomilho (*Thymus vulgaris*), cravo-da-Índia (*Eugenia caryophyllata*) e melaleuca (*Melaleuca alternifolia*).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O presente experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Lavras - Protocolo 029/21(anexo 1).

4.1 Local de realização do estudo

O experimento foi realizado no Parque Francisco de Assis, uma organização sem fins lucrativos que é o principal abrigo de animais abandonados da região de Lavras, o qual realiza o serviço de resgate, cuidados básicos e abrigo. Localiza-se na Rodovia BR-265, Km 341, 980 - Bairro Aeroporto, município de Lavras – MG.

As atividades laboratoriais foram desenvolvidas no Laboratório de Bacteriologia da Faculdade de Zootecnia e Medicina Veterinária da UFLA.

4.2 Animais utilizados no estudo

Para o levantamento da prevalência da otite canina na população do abrigo foram avaliados um total de 120 animais. Todos estes têm uma ficha de identificação (anexo 2) na qual consta a idade aproximada, sexo, peso aproximado, pelagem, e outras características para distingui-los, além de uma foto do animal. Na ficha também é indicado se há presença ou não dos seguintes sinais clínicos sugestivos de otite: linfadenopatia, temperatura corporal, edema, rubor, dor, otohematoma, odor, presença de cerúmen e exsudato, meneio cefálico, cabeça pendular, prurido, presença de corpo estranho no pavilhão auditivo e marcas de arranhaduras na região auricular, sendo estes (exceto temperatura) classificados como discreto, moderado ou avançado por meio de exame físico e otoscopia.

Entre os animais positivos para sinais clínicos da afecção (109) foram selecionado são acaso 62 animais otopatas externos para a realização de citologia e exames microbiológicos (cultura e antibiograma). Os animais foram selecionados após um processo que envolve identificação, avaliação clínica e exame otológico por meio de um otoscópio. Na anamnese, além de informações básicas como raça, sexo, idade, foram avaliados apresenta de outras comorbidades e início dos sintomas.

Após identificação, foi realizada uma avaliação clínica, pesquisando-se a presença de sinais como o meneio cefálico, marcas de arranhões nos pavilhões auditivos (o que indica prurido), cabeça pendular, presença de secreção e odor característico, eritema e inchaço das estruturas do conduto auditivo.

Após essa avaliação clínica, os animais foram submetidos a exame otoscópico, no qual foram avaliadas as estruturas internas do pavilhão auricular do indivíduo, observando se há também edema, eritema, presença de corpo estranho, integridade da membrana timpânica, presença de parasitas e presença de exsudato, cerúmen ou ambos. Animais com indícios de comprometimento de membrana timpânica, podendo indicar otite média, não foram selecionados para as coletas de exames.

4.3 Coleta de exames, citologia e testes laboratoriais

Após avaliação e seleção dos animais, foi realizada coleta do conteúdo auricular para avaliação citológica e cultura. A coleta foi realizada por meio de suabes esterilizados. Estes são gentilmente inseridos no conduto auricular e rotacionados para a coleta da secreção otológica. Animais que apresentavam otite ainda que unilateral foram submetidos a coleta em ambos os pavilhões auriculares.

Após a coleta, a secreção foi utilizada para a confecção de esfregaço para a detecção de *Otodectes cynotis*. As lâminas contendo os esfregaços foram vedadas com outra lâmina colocada por cima e fita adesiva nas laterais, de forma a impedir a saída do parasita, caso este estivesse presente.

Após a confecção dos esfregaços para citologia e microscopia direta, novo suabe foi utilizado para a coleta de conteúdo para fins de cultura microbiológica. Estes são inseridos em meio de transporte (Meio de Stuart) para preservação das amostras.

Chegando ao laboratório, as lâminas passaram por processo de raspagem do conteúdo e foram acrescidas de uma gota de hidróxido de potássio (KOH) a 20% para clarificação do

material que foi então coberto por lamínula e avaliado em microscópio óptico (10X) para identificação de *Otodectes cynotis*.

Para a cultura, os seus preservados em meio de Stuart foram semeados em ágar sangue de equino a 5% para o isolamento de bactérias, tais como *Staphylococcus Streptococcus*; ágar Mac Conkey, para seleção de bactérias Gram negativas, ágar Sabouraud dextrose adicionado de 0,08mg/L de gentamicina para o isolamento de fungos e leveduras e por fim, ágar Sabouraud acrescido de 0,08mg/L de gentamicina e azeite de oliva a 1% para isolamento de *Malassezia* (VIEIRA, 2005; SOUZA; OLIVEIRA; CORTEZ, 2007).

As placas de ágar-sangue e Mac Conkey foram incubadas em aerobiose em estufa a 37°C por 24 a 48 horas. As placas de ágar Sabouraud e Sabouraud suplementado com azeite de oliva foram incubadas em aerobiose em temperatura de 37°C por 7 dias.

Após a incubação, foi feita avaliação de crescimento e os agentes desenvolvidos em ágar sangue e Mac Conkey foram isolados em caldo BHI. Para identificação de leveduras e bactérias foram feitas lâminas coradas com coloração de Gram e utilizaram-se as chaves de identificação propostas por Quinn *et al.* (2005) para as bactérias. A caracterização dos fungos foi realizada com base nas características morfológicas das colônias e características microscópicas dos isolados examinados em esfregaços corados pelo método de Gram.

4.4 Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos convencionais

A avaliação da suscetibilidade dos agentes bacterianos isolados aos antimicrobianos foi realizada pelo método de disco-difusão em ágar, segundo as normas do CLSI (2018) com os antimicrobianos mais usados para o tratamento de otite externa, segundo Oliveira *et al.* (2005). Resumidamente, algumas colônias (3-5) do agente bacteriano foram suspensas em solução salina e ajustadas na concentração de 0,5 na escala de Mc Farland. Esta suspensão foi semeada em placas de ágar Mueller Hinton por meio de suabes (um por placa). Em seguida foram colocados discos feitos de papel-filtro impregnados com os antimicrobianos, respeitando a distância entre eles para não interferir nos halos de inibição do crescimento bacteriano. Essas placas foram incubadas em aerobiose por 24-48 horas à uma temperatura de 37 °C. Após esse período, foi feita a leitura, medindo o diâmetro dos halos, comparando-os à tabela padrão para classificá-los como “sensível (S)” “sensível aumentando a concentração (I)” ou “resistente (R)”. O diâmetro do halo é inversamente proporcional à Concentração Inibitória Mínima (CIM) (MARTINS, 2019).

4.5 Teste de suscetibilidade aos óleos essenciais

Os óleos essenciais testados foram: Tomilho, Melaleuca, Canela Cássia, Capim Limão e Cravo, adquiridos na indústria FERQUIMA Ltda.

Para avaliar a suscetibilidade dos agentes bacterianos frente aos óleos essenciais, foi utilizado o método de microdiluição em caldo, em microplacas esterilizadas de 96 poços de fundo plano, de acordo com a metodologia de Sim *et al.* (2019). Para tal, foi selecionado um total de 50 microrganismos, sendo 25 do grupo *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP) e 25 *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN).

Na primeira linha de pocinhos foram colocados óleos essenciais com meio de cultura em caldo (foram usados Mueller Hinton para bactérias e caldo Sabouraud para leveduras) na diluição de 1:20 (5%). Da segunda à décima primeira linhas de pocinhos foram colocados 100 μL do meio de cultura e foram feitas diluições seriadas múltiplas de 2 de cada óleo, as quais ficaram, portanto, nas concentrações de 5%, 2,5%, 1,25%, 0,63%, 0,31%, 0,16%, 0,08%, 0,04% e 0,02%, respectivamente. A tabela 1 mostra em μL a concentração de óleo essencial correspondente à cada pocinho. A décima linha de pocinhos foi destinada ao controle de crescimento do isolado (contendo somente o meio de cultura e 10 μL do inóculo), com o intuito de avaliar se o isolado cresceu adequadamente no ensaio. Já a décima primeira linha de pocinhos foi reservada para o controle do meio de cultura e esterilidade da microplaca, contendo somente o meio de cultura, de modo a assegurar a esterilidade da microplaca e ausência de contaminação do meio. A última linha de pocinhos foi reservada para a deposição de 200 μL dos inóculos que seriam utilizados nos pocinhos de 1 a 10. Dez μL do inóculo na escala 0, 5 de Mc Farland foi adicionado em cada um dos pocinhos, da primeira à décima linhas. Após estes procedimentos, as microplacas foram incubadas em estufa em temperatura de 37 °C, com tempo de incubação de 24 horas para as bactérias.

Após a incubação, foi realizada a leitura visual dos testes, avaliando-se a presença/ausência de crescimento em cada uma das colunas. A CIM corresponde à maior diluição do óleo essencial, na qual não se observou crescimento do microrganismo (ANVISA, 2008).

Tabela 1: Diluições dos óleos essenciais testadas nos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM)

| Diluições | Porcentagem | Quantidade de óleo ($\mu\text{L}/\text{mL}$) |
|-----------|-------------|--|
| 1 | 5% | 50 |
| 2 | 2,5% | 25 |
| 3 | 1,25% | 12,5 |
| 4 | 0,63% | 6,25 |
| 5 | 0,31% | 3,125 |
| 6 | 0,16% | 1,562 |
| 7 | 0,08% | 0,781 |
| 8 | 0,04% | 0,391 |
| 9 | 0,02% | 0,195 |

4.6 Identificação molecular dos isolados de *Staphylococcus Coagulase Positiva* (SCP)

A identificação dos isolados SCP foi realizada por meio de PCRs específicas utilizando-se de primers específicos para a discriminação das espécies *Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus pseudintermedius*. Os iniciadores utilizados nas PCRs estão descritos abaixo.

Primeiramente, foi feita a extração do DNA com protocolo adotado pelo laboratório de epidemiologia molecular do Departamento de Medicina Veterinária da UFLA de cada uma das amostras. O protocolo ocorreu da seguinte forma: foi feita uma raspagem nas placas de BHI ágar contendo uma bactéria por placa. Essa massa de colônias foi colocada em 1ml de solução PBS1X, depois, em novo tubete, foi colocado 100 μL dessa mistura de massa de colônias com PBS1X e 100 μL de solução TE buffer, homogeneizando a nova mistura.

Em seguida, adicionou-se 500 μL de GES para lisar as células bacterianas e inverteu-se o tubo lentamente, deixando-o depois em repouso por 10 minutos. Após esse período acrescentou-se 250 μL de acetato de amônio à -20°C e manteve os tubetes no gelo durante 10 minutos.

Depois, retirou-se do gelo e acrescentou-se 500 μL de clorofórmio 2-pentanol à -20°C também, misturando vigorosamente os tubetes até se tornarem esbranquiçados. Após essa mistura, os tubetes foram levados para centrifugação por 10 minutos a uma velocidade de 11.000 rpm.

Ao término da centrifugação o conteúdo dos tubetes se dividiram em duas fases. Foi coletado, então, 700 µL de cada sobrenadante e colocados em novos tubetes contendo agora 405 µL de isopropanol à -20 °C e invertendo-os para homogeneizar a solução. Em seguida esses novos tubetes passaram por uma nova centrifugação a 11000 rpm por 10 minutos para precipitar o DNA.

Ao final da centrifugação os sobrenadantes foram descartados e o conteúdo que permaneceu nos tubetes passou por 2 lavagens com 500 µL de etanol 70% cada, centrifugando a 11000 rpm por 5 minutos entre cada lavagem. Por fim, os tubos foram invertidos durante 30 minutos para secagem, foi acrescentado após esse período 50 µL de água Miliq e foram congelados.

Para garantir que houve efetividade no procedimento, fez-se eletroforese com gel de agarose das amostras. O gel é feito da seguinte forma: mistura-se 0,8 gramas de agarose para cada 100 ml de TBE1X (solução tampão), em seguida vai para aquecimento em microondas até a solução ficar transparente. Depois ela é resfriada em torneira até atingir uma temperatura de aproximadamente 40 °C e acrescenta-se 4,8 µL de brometo de etídio para cada 120 ml de solução. Por fim, a mistura é colocada numa cuba e aguarda-se uma hora para completa solidificação do conteúdo.

Ao se solidificar, o gel é transferido para uma nova cuba que contém eletrodos ligados ao aparelho de eletroforese e é submerso por solução tampão de TBE1X. Cada DNA isolado será, portanto, inoculado nesse gel, numa mistura de 3 µL de DNA e 7 µL de TE buffer. Por fim, liga-se o aparelho de eletroforese, deixando-o correr a 110 volts por 20 minutos, durante esse período, amostra se desloca do polo positivo para o negativo. Retira-se, então, o gel e observa-se as bandas em destaque em luz ultravioleta (UV), mostrando sucesso no procedimento de extração de DNA.

Tendo extraído os DNA's, inicia-se a PCR de fato. Foram realizadas reações de PCR individuais para identificar as espécies *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus aureus*. Para *Staphylococcus pseudintermedius*, os iniciadores utilizados foram NUC F5' AACACCGAGTAATACGCCG 3'RNUC5'TTTAGCGTTCCCAAATGTTTCAG3'. Tamanho de fragmento de 780 pb (CHITRA; JAYANTHY; NAGARAJAN, 2015). E para *Staphylococcus aureus*, os iniciadores NUC F AGTTCAGCAAATGCATCACA e NUCR TAGCCAAGCCTTGACGAACT. Tamanho de fragmento de 100 pb (CREMONESI *et al.*, 2005).

Para a primeira espécie, o protocolo de PCR contou dos seguintes reagentes: 11, 25 µL de água, 2,5 µL de solução tampão, 2,5 µL de DNTP, 0,75 µL de MgCl, 5 µL de mix primer, 1 µL de TAQ e dois µL de DNA para cada amostra. Já para a segunda, foram utilizados: 10 µL de água, 2,5 µL de solução tampão, 2,5 µL de DNTP, 0,75 µL de Mg Cl, 2,5 µL de primer F, 2,5 µL de primer R, 0,25 µL de TAQ e 4 µL de DNA para cada amostra.

Depois de pipetados os reagentes, os tubetes de 200 µL foram colocados no termociclador, no qual programou-se os seguintes ciclos: para a primeira espécie, baseando-se no protocolo de Chitra, Jayanthi e Nagarajan (2015) foram 30 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 30 ciclos de 60°C por 30 segundos, 30 ciclos de 72 °C por 30 segundos e extensão final de 5 minutos a 72°C. Para a segunda espécie, baseando-se no protocolo de Cremonesi *et al.* (2005) foi adotado um ciclo de desnaturação inicial a 94 °C por 5 minutos, 30 ciclos a 94°C por 1 minuto, reaquecimento a 56°C por 1 minuto, extensão a 68 °C por 1 minuto e extensão final a 72 °C por 7 minutos. Foi feita a PCR para *Staphylococcus pseudintermedius* primeiro e os isolados negativos passaram por PCR para *Staphylococcus aureus*.

5. HIPÓTESES

- 1- A otite canina apresenta alta prevalência entre os cães do abrigo Parque Francisco de Assis.
- 2- Diferentes agentes estão envolvidos na etiologia da otite nos cães do Parque Francisco de Assis, incluindo bactérias, fungos e parasitos.
- 3- O fenômeno da resistência a antimicrobianos está presente entre os agentes bacterianos envolvidos na etiologia da otite nos cães do Parque Francisco de Assis.
- 4- Medicamentos à base de óleos essenciais têm boa efetividade *in vitro* contra os patógenos bacterianos causadores da otite externa canina.

6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Dos 120 animais avaliados, apenas 11 não apresentaram sinais clínicos sugestivos de otite (9,17%) e 109 mostraram pelo menos um sinal clínico (90,83%). Destes 109 animais sintomáticos (90,83%), 62 foram submetidos à coleta (56,88%). A maioria dos animais submetidos a coleta apresentaram ao exame microbiológico mais que um agente patogênico

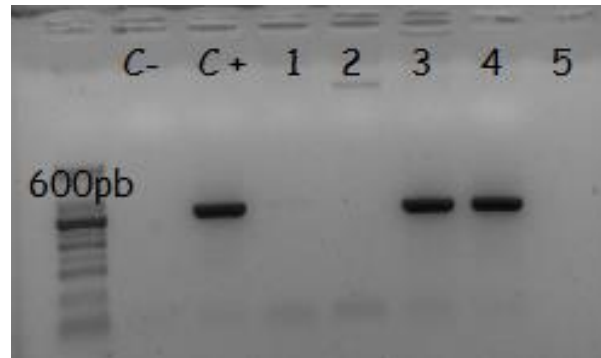
(etiologia mista). Desses animais amostrados para exames microbiológicos (62), 21 apresentaram *Otodectes cynotis* ao exame microscópico (33,87%), 56 apresentaram crescimento de *Malassezia* nas culturas (90,32%), 12 animais apresentaram crescimento de outras leveduras (19,36%), 15 animais apresentaram crescimento de *Staphylococcus* coagulase positiva (24,19%) e 9 coagulase negativa (14,52%), cinco apresentaram crescimento de *Streptococcus* (8,07%), um de fungo miceliano (1,61%) e um bastonete Gram negativo (1,61%). Entre os animais otopatas submetidos a coleta (ambos os pavilhões auriculares foram amostrados), 15 foram positivos para *Staphylococcus* Coagulase Positiva (SCP), tendo sido isolados 41 SCP, sendo 30 cepas de *Staphylococcus pseudintermedius*, um isolado de *Staphylococcus aureus* e 10 isolados de SCP não identificados (não *S. aureus* e não *S. pseudintermedius*). Na tabela 2, encontram-se compilados os resultados dos testes microbiológicos. Ilustrações da eletroforese dos produtos de PCR para caracterização dos isolados SCP podem ser visualizadas nas figuras 1 e 2.

Tabela 2: Agentes isolados a partir dos testes microbiológicos.

| Agentes | Quantidade |
|---|------------|
| <i>Otodectes cynotis</i> | 21 |
| <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> | 30 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 1 |
| Outros <i>Staphylococcus</i> Coagulase Positiva | 10 |
| <i>Staphylococcus</i> Coagulase Negativa | 9 |
| <i>Streptococcus</i> sp. | 5 |
| <i>Malassezia</i> sp. | 56 |
| Outras leveduras | 12 |
| Fungo miceliano | 1 |
| Bacilos Gram Negativos | 1 |

Staphylococcus pseudintermedius (*S. pseudintermedius*), *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), SCP (*Staphylococcus* coagulase positiva), *Staphylococcus* coagulase negativa (SCN) e Bastonetes Gram Negativos (BGN).

Figura 1: Imagem negativa da eletroforese dos produtos de amplificação do gene *NUC* para caracterização de *Staphylococcus pseudintermedius*. As bandas realçadas indicam as amostras positivas. C-: controle negativo, C+: controle positivo.



Fonte: Autor (2021)

Figura 2: Imagem negativa da eletroforese dos produtos de amplificação do gene *NUC* para caracterização de *Staphylococcus aureus*. A amostra selecionada por contorno vermelho à direita apresenta banda em destaque, indicando positividade para *Staphylococcus aureus*. C-: controle negativo, C+: controle positivo.



Fonte: Autor (2021)

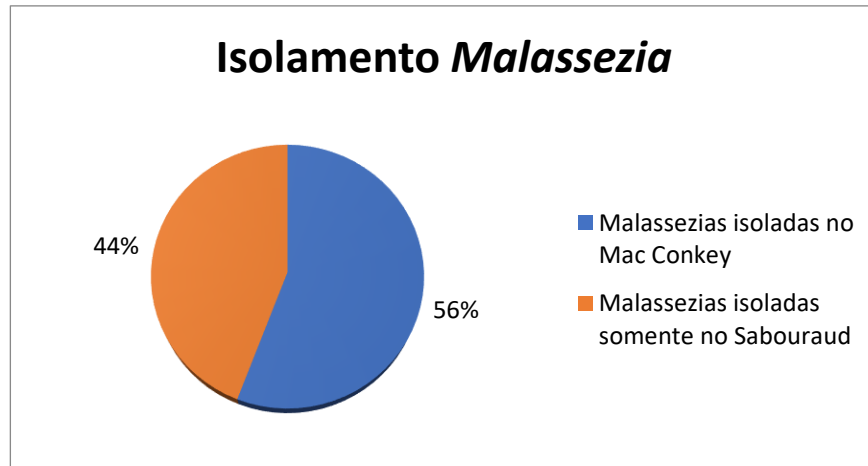
A prevalência de animais otopatas no parque Francisco de Assis foi de 90,83% (109/120), mostrando-se bastante elevada em comparação com estudos realizados em pacientes de clínicas (KORBELIK *et al.*, 2018). Essa alta prevalência pode estar associada a diversos fatores predisponentes, como estresse devido à alta densidade populacional, à conglomeração de animais sadios e otopatas devido à restrição de espaço, ao excesso de umidade ambiental devido à higienização diária das baias, bem como a transmissão dos agentes envolvidos na afecção por fômites como galochas e aventais dos funcionários (FAZAKERLEY *et al.*, 2010; QUINN *et al.*, 2005).

Um ponto importante a ser salientado aqui é que a condição de estresse dos animais em função da alta densidade nas baias pode ser um fator que justifica a elevada prevalência da otite na população estudada (OLIVEIRA *et al.*, 2012). A maioria dos agentes identificados nos animais otopatas, incluindo *Staphylococcus* spp. e *Malassezia* spp., fazem parte da microbiota auricular e apresentam caráter oportunista, podendo causar doença em situação de imunossupressão (CHANUSSOT; ARENAS, 2006; LOPES, 2018; TAYLOR, 2020). Deve-se destacar também que a otite é um processo multifatorial e que pode ser associada com fatores pré-disponentes, tais como raça, umidade, orelhas pendulares, excesso de pelos, corpos estranhos, dermatites ou alergias alimentares (JACOBSON, 2002).

Entre os agentes com maior prevalência destacaram-se a *Malassezia*, com 90,32%, *Otodectes cynotis* (33,87%) *Staphylococcus* Coagulase Positiva (24,19%) e o grupo *Staphylococcus* Coagulase Negativa (14,52%). A alta prevalência de *Malassezia* nos condutos auditivos de cães é comum, sendo um dos principais agentes etiológicos nas otopatias caninas (BAPTISTA *et al.*, 2010).

Um resultado bastante inusitado foi o crescimento da *Malassezia* em ágar Mac Conkey, um meio geralmente direcionado para o isolamento de bactérias Gram negativas (Quinn *et al.*, 2005). Na figura 3, pode-se comparar as taxas de isolamento deste agente nos meios ágar Mac Conkey e ágar Sabouraud. Tal fenômeno pode ser atribuído à presença de sais de bile neste meio. Yang (2015) relata os sais de bile como componentes de meios seletivos para isolamento de *Malassezia*. Este resultado sugere a possibilidade de utilização deste meio para o isolamento de referido agente, no entanto, estudos mais detalhados são necessários para se validar a utilização deste meio para as diferentes espécies do gênero.

Figura 3: Porcentagem de *Malassezias* isoladas no meio de cultura Mac Conkey e de *Malassezia* isoladas somente no meio de cultura Sabouraud, que é específico para fungos e leveduras.



Fonte: Autor (2021)

Quanto a prevalência de *Otodectes cynotis* (33,87%), Arther *et al.* (2015) relatam presença do agente em cerca de 50% dos casos, entretanto no nosso estudo embora o agente tenha apresentado uma prevalência alta, esta foi inferior à citada pelo autor.

Entre os cães otopatas amostrados (62), 15 apresentaram cultura positiva para *Staphylococcus coagulas* e positiva. É importante destacar que nestes animais otopatas, sempre se amostraram ambos os pavilhões auriculares o que resultou no isolamento de 41 SCP.

A maioria dos isolados de SCP foi identificada por meio da PCR como sendo *Staphylococcus pseudintermedius*, correspondendo a 73,17% da população de SCP, seguido de SCP não identificadas, equivalente a 24,39%, e *Staphylococcus aureus*, representando 2,44%.

Diferentes estudos apontaram alta prevalência de *Staphylococcus coagulase* positiva em análises de conduto auditivo e pele, mostrando a importância etiológica deste patógeno (POSSEBON; KAISER; MARTINS, 2015; MARTINS, 2020), o que corrobora os nossos resultados. Nossos resultados apontaram alta prevalência de *Staphylococcus pseudintermedius* nos cães otopatas, porém com baixa prevalência de *Staphylococcus aureus*, divergindo neste ponto dos resultados apresentados obtidos por Santos (2019).

Alta prevalência de *Staphylococcus pseudintermedius* em cães otopatas também foi relatada por outros autores (Oliveira *et al.*, 2005; Oliveira *et al.*, 2006). Outros estudos também apontaram perfis etiológicos semelhantes aos observados neste trabalho (ZUR, 2011; SILVA, 2014), mostrando a alta prevalência de *Staphylococcus pseudintermedius* e sua importância em casos de otite. No que se refere aos agentes Gram negativos, houve apenas uma amostra isolada, contrapondo os resultados apresentados por Oliveira *et al.* (2005) e Santos *et al.* (2019), os quais

citam alta prevalência de agentes como *Proteus spp.* e *Pseudomonas aeruginosa* na etiologia das otites caninas.

O cunho multifatorial, com envolvimento de bactérias, fungos e parasitos, como demonstrado em nosso estudo e corroborado por vários pesquisadores (OLIVEIRA *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2019; ARTHUR *et al.*, 2015; POSSEBON; KAISER; MARTINS, 2015) é um aspecto que pode limitar a eficiência dos protocolos terapêuticos usuais que visam em sua maioria o combate aos agentes bacterianos. Tal fato, salienta a necessidade de se identificar os agentes envolvidos na etiologia dos casos afim de que o tratamento seja mais bem direcionado, considerando que os protocolos terapêuticos diferem para estes diferentes grupos de agentes (MUELLER, 2009; CASTRO *et al.*, 2006; SHANKS *et al.*, 2000).

Os testes de suscetibilidade aos antibióticos foram realizados somente para os grupos predominantes entre os agentes bacterianos, incluindo SCP, SCN e *Streptococcus spp.* Os resultados estão compilados nas tabelas 3-4, segundo os critérios de interpretação do CLSI (2018).

Tabela 3: Tabela de interpretação de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos convencionais usados nos testes *in vitro* para *Staphylococcus Coagulase Positiva* utilizando-se o método em disco-difusão em ágar, de acordo com as normas do CLSI (2018).

| Antimicrobianos | Comportamento frente aos antimicrobianos | | |
|-----------------|--|----|----|
| | R | I | S |
| ERI | 21 | 11 | 6 |
| PEN | 37 | 0 | 1 |
| OXA | 23 | 1 | 14 |
| MRB | 13 | 2 | 19 |
| RIF | 4 | 3 | 28 |
| CLO | 3 | 6 | 28 |
| VAN | 8 | 1 | 29 |
| CLI | 21 | 2 | 15 |
| CIP | 12 | 2 | 24 |
| SUT | 22 | 3 | 13 |
| TET | 1 | 12 | 25 |
| GEN | 9 | 2 | 27 |

Eritromicina (ERI), penicilina (PEN), oxacilina (OXA), marbofloxacina (MRB), rifampicina (RIF), cloranfenicol (CLO), vancomicina (VAN), clindamicina (CLI), ciprofloxacino (CIP), sulfazotrim (SUT), tetraciclina (TET) e gentamicina (GEN). Resistente (R), sensível aumentando a exposição (I) e sensível (S).

Tabela 4: Resultados de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos convencionais usados nos testes *in vitro* frente *Staphylococcus* Coagulase Negativos, utilizando-se o método em disco-difusão em ágar (CLSI, 2018).

| Antimicrobianos | Comportamento frente aos antimicrobianos | | |
|-----------------|--|----|----|
| | R | I | S |
| ERI | 11 | 10 | 12 |
| PEN | 27 | 0 | 6 |
| OXA | 18 | 4 | 11 |
| MRB | 12 | 2 | 18 |
| RIF | 3 | 0 | 30 |
| CLO | 1 | 1 | 31 |
| VAN | 3 | 0 | 30 |
| CLI | 8 | 6 | 18 |
| CIP | 10 | 5 | 18 |
| SUT | 15 | 3 | 15 |
| TET | 6 | 8 | 19 |
| GEN | 8 | 1 | 24 |

Eritromicina (ERI), penicilina (PEN), oxacilina (OXA), marbofloxacina (MRB), rifampicina (RIF), cloranfenicol (CLO), vancomicina (VAN), clindamicina (CLI), ciprofloxacino (CIP), sulfazotrim (SUT), tetraciclina (TET) e gentamicina (GEN). Resistente (R), sensível aumentando a exposição (I) e sensível (S).

Tabela 5: Resultados de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos convencionais usados nos testes *in vitro* para *Streptococcus* spp. pelo método em disco-difusão em ágar (CLSI, 2018).

| Antimicrobianos | Comportamento frente aos antimicrobianos | | |
|-----------------|--|---|---|
| | R | I | S |
| ERI | 1 | 1 | 1 |
| PEN | 2 | 0 | 1 |
| OXA | 2 | 0 | 1 |
| MRB | 1 | 0 | 2 |
| RIF | 0 | 0 | 3 |
| CLO | 0 | 0 | 3 |
| VAN | 1 | 0 | 2 |
| CLI | 0 | 2 | 1 |
| CIP | 0 | 1 | 2 |
| SUT | 1 | 0 | 2 |
| TET | 0 | 1 | 2 |
| GEN | 0 | 0 | 3 |

Eritromicina (ERI), penicilina (PEN), oxacilina (OXA), marbofloxacina (MRB), rifampicina (RIF), cloranfenicol (CLO), vancomicina (VAN), clindamicina (CLI), ciprofloxacino (CIP), sulfazotrim (SUT), tetraciclina (TET) e gentamicina (GEN). Resistente (R), sensível aumentando a exposição (I) e sensível (S).

Os resultados dos testes de suscetibilidade *in vitro* para os antibióticos apontaram maiores taxas de sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* para a vancomicina (85,71%), seguido de rifampicina (82,14%) e cloranfenicol (75%), contrapondo Petrov (2013) que relatou resistência ao cloranfenicol. Para estes mesmos agentes foram observadas taxas de resistência elevadas para penicilina (96,43%), o que é corroborado pelos estudos de Enright *et al.* (2002), seguido por sulfazotrim (53,57%).

Para as demais espécies de SCP não identificadas, os antimicrobianos de maior eficiência *in vitro* foram a rifampicina (77,78%), seguido de cloranfenicol (77,78%) e vancomicina (55,56%). Para estes mesmos isolados, foram observados níveis mais elevados de resistência para a penicilina (100%), oxacilina (88,89%) e clindamicina (88,89%), contrapondo-se, novamente a Petrov (2013) que relatou resistência de *Staphylococcus* spp. frente ao cloranfenicol.

No entanto, nossos resultados foram corroborados por Enright *et al.* (2002) que apontaram sensibilidade de *Staphylococcus* spp. frente à vancomicina e resistência frente à betalactâmicos.

Para o grupo de *Staphylococcus* coagulase negativos, verificou-se que cloranfenicol (93,94%), rifampicina (90,91%) e vancomicina (90,91%) foram os antimicrobianos mais efetivos nos testes *in vitro* (PETROV, 2013; ENRIGHT *et al.*, 2002). Por outro lado, os maiores índices de resistência foram observados para os betalactâmicos (penicilina 81,82%, oxacilina 54,55%) e sulfazotrim (45,46%), corroborando aos estudos de Enright *et al.* (2002).

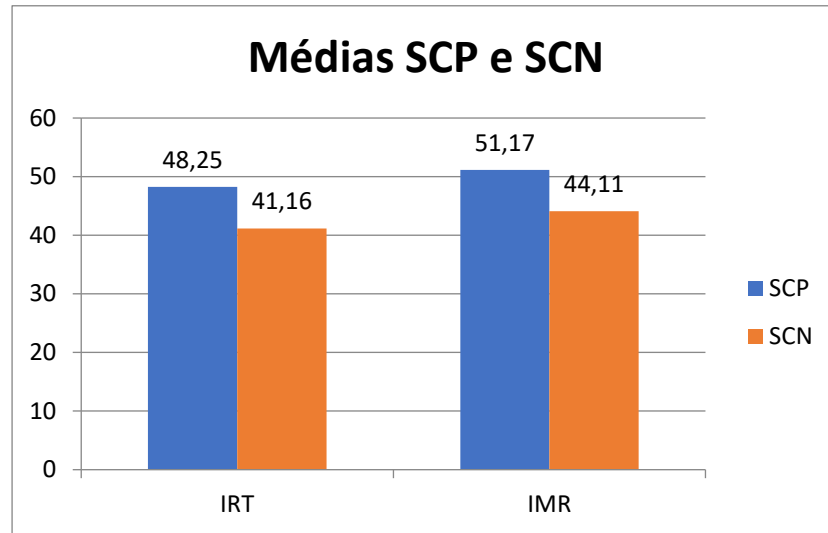
Por fim, para os *Streptococcus*, os antimicrobianos que apresentaram maior ação antibacteriana nos testes *in vitro* foram a rifampicina (100%), cloranfenicol (100%) e gentamicina (100%), e os de maiores taxas de resistência foram a penicilina (66,67%) e a oxacilina (66,67%).

Os isolados SCP apresentaram índice de resistência de 39,47% para a marbofloxacina enquanto os SCN este índice foi de 42,42% para *Staphylococcus* Coagulase Negativos. Estes altos índices de resistência se contrapõem aos resultados apresentados por Junco e Barrasa (2002).

Os resultados apontaram nas populações de SCP, SCN e *Streptococcus* estudadas a presença de cepas resistentes à sulfazotrim, penicilina e oxacilina. Oliveira *et al.* (2005) relatam resistência de *Staphylococcus* spp. frente à oxacilina, antibiótico pertencente às penicilinas antiestafilocócicas, e autores como Rincón *et al.* (2010), Tavares (2000) e Governado (2002) apontam, além da resistência a oxacilina, resistência à vancomicina, glicopeptídeo destinado principalmente para uso humano devido à boa eficiência. Esses relatos culminam à um problema de saúde coletiva, uma vez que antimicrobianos de uso restrito para tratamentos específicos em seres humanos, tais como a rifampicina e vancomicina, podem perder sua eficácia e restringir, desta forma, as alternativas de tratamento em processos infecciosos em seres humanos.

Os índices de resistência total (IRT) e os índices de múltipla resistência (IMR), nos quais se avaliam a resistência por número e classe de antibióticos testados, respectivamente, por espécies bacterianas isoladas estão registrados na tabela 5. Em geral, os índices de resistência foram mais elevados para SCP em relação aos SCN (Figura 3), embora em ambos os grupos níveis elevados de resistência e multirresistência tenham sido observados.

Figura 4: índices de resistência total (IRT) e de múltipla resistência (IMR) dos grupos *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCP) e *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN) frente aos antimicrobianos.



Fonte: Autor (2021)

Tabela 6: Índices de resistência total (IRT) e os índices de múltipla resistência (IMR) por espécies bacterianas isoladas de cães otopatas do abrigo São Francisco, no período de 2021-2022.

| ESPÉCIE | MÉDIA (%) | |
|--|--------------|--------------|
| | IRT | IMR |
| <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> | 42,86 | 45,24 |
| <i>Staphylococcus aureus</i> | 50,00 | 55,56 |
| Outras SCP | 64,82 | 69,14 |
| SCN | 41,16 | 44,11 |
| <i>Streptococcus</i> spp. | 36,11 | 40,74 |
| MÉDIA GLOBAL (%) | IRT | IMR |
| | 44,60 | 47,60 |

Staphylococcus Coagulase Positiva (SCP), *Staphylococcus* Coagulase Negativa (SCN), Índice de Resistência Total (IRT) e Índice de Múltipla Resistência (IMR).

Os resultados apontaram na população bacteriana testada elevados índices de multirresistência e de resistência a antibióticos de uso comum no tratamento de otite externa canina e a antimicrobianos de uso na medicina humana, como é o caso da oxacilina e da vancomicina (TAVARES, 2000).

É importante salientar que a presença de isolados resistentes à vancomicina, antimicrobiano geralmente utilizado no tratamento das infecções por *Staphylococcus* meticilina resistentes em seres humanos, e à rifampicina, antimicrobiano geralmente utilizado no tratamento da brucelose e da tuberculose humana gera riscos potenciais para a saúde pública em função do estreito contato entre os pets e os tutores (MARTINS, 2020).

Os resultados obtidos em nosso estudo são preocupantes, uma vez que sempre se associa o problema da resistência dos patógenos bacterianos ao aumento da pressão seletiva, isto é ao uso intensivo e indiscriminado de antimicrobianos, entretanto tal fato geralmente não se verifica para a população canina objeto do presente estudo.

Staphylococcus, principal gênero identificado na população otopata testada, apresentam potencial zoonótico (SOMAYAJI *et al.*, 2016) que é intensificado em função do estreito contato entre os pets domésticos e os tutores. Tal fato pode gerar sérios problemas na saúde pública, uma vez que estes agentes podem causar processos infecciosos de difícil tratamento na população e ainda funcionarem como reservatórios de genes de resistência que podem ser intercambiados com a microbiota humana (MARTINS, 2020).

A que se destacar também os níveis elevados de resistência aos antimicrobianos betalactâmicos (penicilina e oxacilina), não somente entre SCP e SCN, mas também entre os isolados de *Streptococcus*. Este achado já apresenta autores que corroboram ao assunto, como é o caso de Miotto (2001) que aponta resistência de *Streptococcus pneumoniae* frente à betalactâmicos.

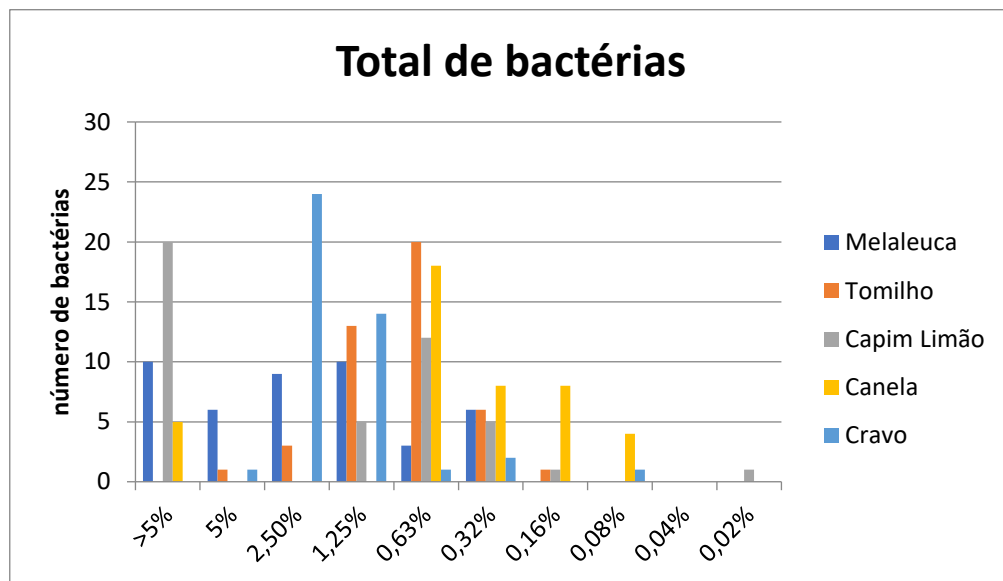
7. ÓLEOS ESSENCIAIS

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais testados foi avaliada com base nos índices CIM50 e CIM90, entretanto, somente foi possível determinar os índices de MIC90 para os óleos essenciais de tomilho e cravo (21,9 µL/mL e 27,73 µL/mL, respectivamente). Os resultados dos testes de concentração inibitória mínima (CIM 50 e 90) para os óleos essenciais foram compilados na tabela 6 e figuras que se seguem.

Tabela 7: A atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a patógenos isolados de otite canina, com base nos índices CIM50 e CIM90.

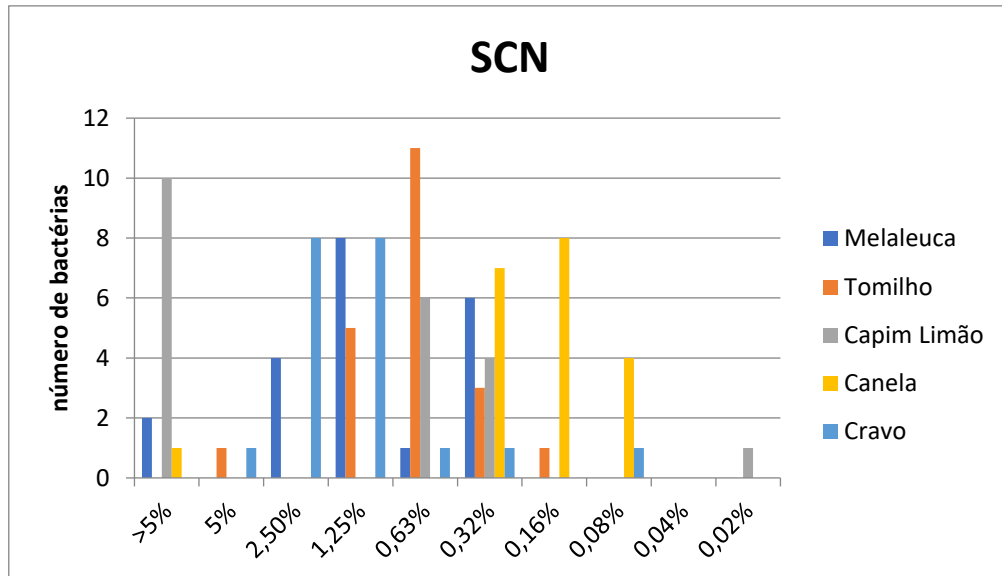
| Óleos | Melaleuca | Tomilho | Capim Limão | Canela | Cravo |
|--------------------------------------|------------|---------|-------------|------------|-------|
| CIM50 ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | 34,11 | 7,3 | 12,26 | 3,47 | 27,73 |
| CIM90 ($\mu\text{L}/\text{mL}$) | Indefinido | 21,09 | Indefinido | Indefinido | 27,73 |

Figura 5: Distribuição de frequências de concentrações inibitórias mínimas para os óleos de melaleuca, tomilho, capim limão, canela e cravo frente aos isolados bacterianos (total de isolados).



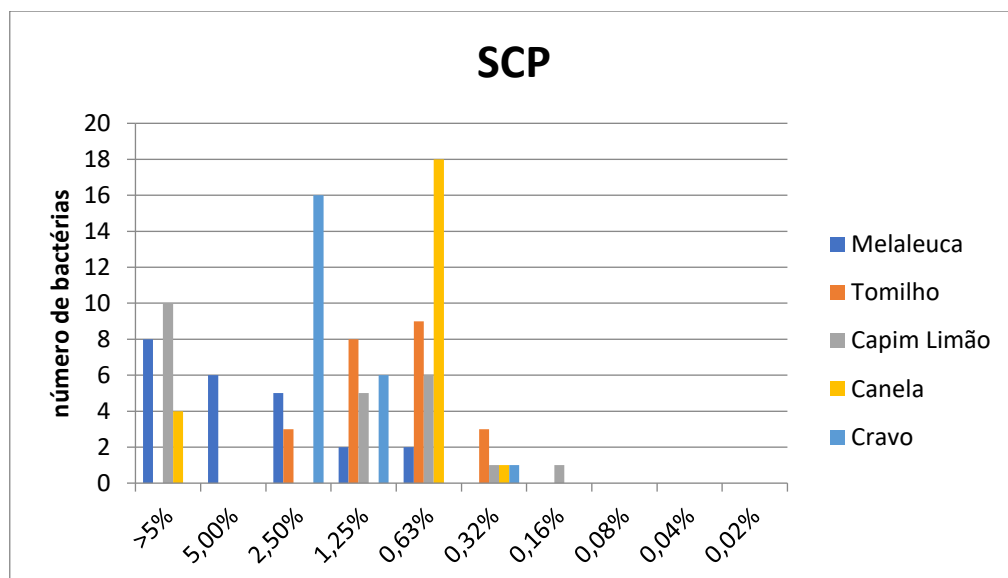
Fonte: Autor (2021)

Figura 6: Distribuição de frequências de concentrações inibitórias mínimas para os óleos de melaleuca, tomilho, capim limão, canela e cravo frente aos isolados de *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN).



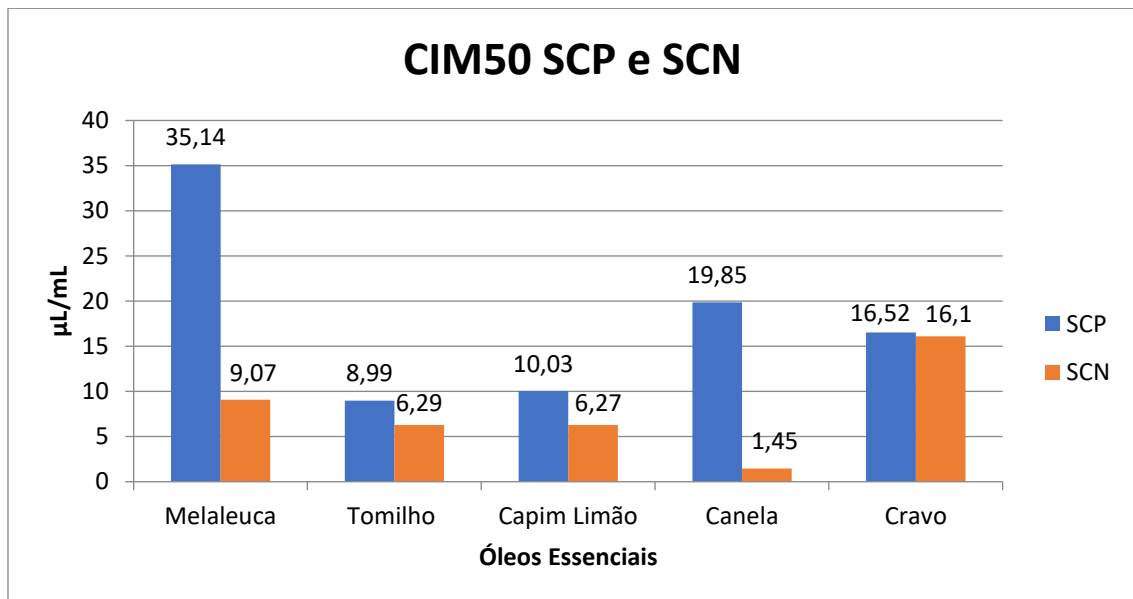
Fonte: Autor (2021)

Figura 7: Distribuição de frequências de concentrações inibitórias mínimas para os óleos de melaleuca, tomilho, capim limão, canela e cravo frente aos isolados de *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCP). As tabelas contendo os resultados de CIM para óleos essenciais frente aos agentes bacterianos estão relacionadas no anexo 3.



Fonte: Autor (2021)

Figura 8: Resultados dos testes de concentração inibitória mínima 50% (CIM50) para os óleos de melaleuca, tomilho, capim limão, canela e cravo frente aos isolados de *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCP) e isolados de *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN)



Fonte: Autor (2021)

Os valores de CIM50 para todos os óleos essenciais testados sempre foram inferiores para SCN em relação aos SCP, especialmente no que se refere aos óleos de melaleuca e de canela (Figura 8). Este mesmo comportamento foi observado para os antibióticos convencionais, demonstrando que os SCP em geral apresentam resistência intrínseca maior que SCN. Estudos adicionais são necessários para explicar este comportamento diferenciado entre SCP e SCN frente aos antimicrobianos.

O óleo essencial de canela nos testes *in vitro* apresentou a maior atividade antimicrobiana de acordo com os índices de CIM50, seguido pelo óleo essencial de tomilho e de capim limão. Os óleos essenciais de cravo e de melaleuca apresentam valores de CIM50 mais elevados.

O óleo de canela também demonstrou melhor desempenho na espécie *Staphylococcus pseudintermedius* e no grupo *Staphylococcus* Coagulase Negativa. Costa (2009) também relatou boa eficiência do óleo essencial de canela frente *Staphylococcus*, tendo alta atividade bacteriostática e Freire *et al.* (2014) apontou eficiência na ação antibacteriana dos óleos essenciais de canela e tomilho frente a cepas de *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. Outros estudos prévios apontaram boa eficiência *in vitro* contra agentes, como *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Candida albicans* (SANTURIO *et al.*, 2007; ALMEIDA *et al.*, 2011; NASCIMENTO *et al.*, 2014).

O presente estudo apontou níveis elevados de resistência dos patógenos bacterianos isolados frente aos antimicrobianos clássicos utilizados no tratamento da otite canina, os resultados dos testes de CIM com óleos essenciais apontaram a perspectiva de utilização destes no tratamento tópico da otite canina. É importante salientar, no entanto, que estudos adicionais devem ser realizados de forma a se avaliar se as concentrações inibitórias observadas *in vitro* apresentam também ação antimicrobiana *in vivo* e potenciais efeitos adversos dos óleos essenciais. Corroboram esta assertiva a necessidade de desenvolvimento de fármacos alternativos para o tratamento das infecções bacterianas ocasionadas por micro-organismos multirresistentes importantes para a saúde coletiva.

Nos anexos 3 e 4 são ilustrados os resultados dos testes de concentração inibitória mínima (CIM) para óleos essenciais frente os diferentes grupos de patógenos isolados.

Nas tabelas 8 a 12, encontram-se separados os resultados dos ensaios de CIM para cada óleo essencial testado.

Tabela 8: Resultados dos ensaios de concentração Inibitória Mínima (CIM ou MIC) do óleo essencial de melaleuca frente aos isolados de *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCP) e *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN).

| Melaleuca | Nº total de cepas susceptíveis | Frequência acumulada | Porcentagem % |
|-----------|--------------------------------|----------------------|---------------|
| 0,02% | 0 | 0 | 0,00% |
| 0,04% | 0 | 0 | 0,00% |
| 0,08% | 0 | 0 | 0,00% |
| 0,16% | 0 | 0 | 0,00% |
| 0,32% | 6 | 6 | 13,64% |
| 0,63% | 3 | 9 | 6,82% |
| 1,25% | 10 | 19 | 22,73% |
| 2,50% | 9 | 28 | 20,45% |
| 5,00% | 6 | 34 | 13,64% |
| >5,00% | 10 | 44 | 22,73% |

Tabela 9: Resultados dos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de tomilho frente aos isolados de *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCP) e *Staphylococcus* Coagulas e Negativos (SCN).

| Tomilho | Nº total de cepas susceptíveis | Frequência acumulada | Porcentagem % |
|---------|--------------------------------|----------------------|---------------|
| 0,02% | 0 | 0 | 0,00% |
| 0,04% | 0 | 0 | 0,00% |
| 0,08% | 0 | 0 | 0,00% |
| 0,16% | 1 | 1 | 2,33% |
| 0,32% | 6 | 7 | 13,95% |
| 0,63% | 20 | 27 | 46,51% |
| 1,25% | 13 | 40 | 30,23% |
| 2,50% | 2 | 42 | 4,65% |
| 5,00% | 1 | 43 | 2,33% |
| >5,00% | 0 | 43 | 0,00% |

Tabela 10: Resultados dos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de Capim Limão frente aos isolados de *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCP) e *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN)

| Capim Limão | Nº total de cepas susceptíveis | Frequência acumulada | Porcentagem % |
|-------------|--------------------------------|----------------------|---------------|
| 0,02% | 1 | 1 | 2,00% |
| 0,04% | 0 | 1 | 0,00% |
| 0,08% | 0 | 1 | 0,00% |
| 0,16% | 7 | 8 | 14,00% |
| 0,32% | 5 | 13 | 10,00% |
| 0,63% | 12 | 25 | 24,00% |
| 1,25% | 5 | 30 | 10,00% |
| 2,50% | 0 | 30 | 0,00% |
| 5,00% | 0 | 30 | 0,00% |
| >5,00% | 20 | 50 | 40,00% |

Tabela 11: Resultados dos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de Canela frente aos isolados de *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCP) e *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN).

| Canela | Nº total de cepas susceptíveis | Frequência acumulada | Porcentagem % |
|--------|--------------------------------|----------------------|---------------|
| 0,02% | 0 | 0 | 0,00% |
| 0,04% | 0 | 0 | 0,00% |
| 0,08% | 4 | 4 | 9,30% |
| 0,16% | 8 | 12 | 18,60% |
| 0,32% | 8 | 20 | 18,60% |
| 0,63% | 18 | 38 | 41,90% |
| 1,25% | 0 | 38 | 0,00% |
| 2,50% | 0 | 38 | 0,00% |
| 5,00% | 0 | 38 | 0,00% |
| >5,00% | 5 | 43 | 11,60% |

Tabela 12: Resultados dos ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) do óleo essencial de Cravo frente aos isolados de *Staphylococcus* Coagulase Positivos (SCP) e *Staphylococcus* Coagulase Negativos (SCN)

| Cravo | Nº total de cepas susceptíveis | Frequência acumulada | Porcentagem % |
|--------|--------------------------------|----------------------|---------------|
| 0,02% | 0 | 0 | 0,00% |
| 0,04% | 0 | 0 | 0,00% |
| 0,08% | 1 | 1 | 2,33% |
| 0,16% | 0 | 1 | 0,00% |
| 0,32% | 2 | 3 | 4,65% |
| 0,63% | 1 | 4 | 2,33% |
| 1,25% | 14 | 18 | 32,60% |
| 2,50% | 24 | 42 | 55,81% |
| 5,00% | 1 | 43 | 2,33% |
| >5,00% | 0 | 43 | 0,00% |

8. CONCLUSÕES

Com o estudo realizado foi possível concluir que há, de fato, alta prevalência de otite nos caninos do abrigo municipal de Lavras – MG.

Malassezia spp., *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus Coagulase Negativos*, bem como o ácaro *Otodectes cynotis* foram os agentes mais prevalentes na etiologia da enfermidade.

Observou-se alta taxa de resistência de *Staphylococcus pseudintermedius* e *Staphylococcus Coagulase Negativos* frente aos antimicrobianos convencionais, fator de grande preocupação, visto que trata-se de agentes com potencial zoonótico e que, portanto, podem ocasionar riscos à saúde pública.

Os óleos essenciais de maior eficiência antimicrobiana nos testes *in vitro* foram os de canela cássia e capim limão, demonstrando ser uma alternativa a ser estudada para o tratamento de otites ocasionadas pelo gênero *Staphylococcus*.

9. REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. Manual clinical and Laboratory Standards Institute. Brasília, 2008. (CLSI - antigo NCCLS).

ALMEIDA, M. D. S. et al. Isolamento microbiológico do canal auditivo de cães saudáveis e com otite externa na região metropolitana de Recife, Pernambuco. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 36, n. 1, p. 29-32, 2016.

ANGUS, J. C. Otitic cytology in health and disease. **Veterinary Clinics: Small Animal Practice**, v. 34, n. 2, p. 411-424, 2004.

ARAÚJO, M. J. C. **Óleos essenciais para o controle de *Plutellaxylostella* (Linnaeus) (Lepidoptera: PLUTELLIDAE) e *Tetranychusurticaekoch* (Acari: TETRANYCHIDAE)**. 2015. 114 f. Tese (Doutorado em Entomologia Agrícola) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife - PE, 2015.

ARTHER, R. G. et al. Clinical evaluation of the safety and efficacy of 10% imidacloprid+ 2.5% moxidectin topical solution for the treatment of ear mite (*Otodectes cynotis*) infestations in

- dogs. **Veterinary Parasitology**, v. 210, n. 1-2, p. 64-68, 2015.
- BAECK, G. W. et al. Isolation and characterization of in Jeju Island sp from diseased flounder. **Veterinary Science**, v. seven, p. 53-58, 2006.
- BANSODE, V. J. A review on pharmacological activities of Cinnamomum cassia Blume. **International Journal of Green Pharmacy**, v. 6, n. 2, p. 102-108, 2012.
- BAUDOUX, D. **O grande manual da aromaterapia**. 1.ed. rev. e atual. Belo Horizonte: Editora Laszlo, 2018.
- BECERRA, G. et al. Mecanismo de resistência a antimicrobianos en bacterias. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología**, v. 29, n. 2, p. 70-76, 2009.
- BISMARCK, D. et al. Antifungal in vitro Activity of Essential Oils against Clinical Isolates of Malassezia pachydermatis from Canine Ears: A Report from a Practice Laboratory. **Complementary Medicine Research**, v. 27, n. 3, p. 143-154, 2020.
- BLANCO, J. L. et al. Optimum incubation conditions for the isolation of yeasts from canine otitis externa. **Journal of Veterinary Medicine**, v. 47, p. 599-605, 2000.
- BODEY, G. P. et al. Infections Caused by Pseudomonas aeruginosa. **National Library of Medicine**, v. 5, n. 2, p. 279-313, 1983.
- BURT, S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods - A review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CASTRO, T. L. et al. Mecanismos de resistência da cândida sp a antifúngicos. **Infarma**, v. 18, p. 30-35, 2006.
- CAVALCANTI, Y. W.; DE ALMEIDA, L. F. D.; PADILHA, W. W. N. Atividade antifúngica de três óleos essenciais sobre cepas de Cândida. **Revista Odontológica do Brasil Central**, v. 20, n. 52, p. 68-73, 2011.
- CHAIEB, K. et al. Antioxidant properties of the essential oil of Eugenia caryophyllata and its antifungal activity against a large number of clinical Cândida species. **Mycoses**, v. 50, n. 5, p. 403-406, 2007.
- CHALMERS, N. I. et al. Characterization of a Streptococcus sp. - Veillonella sp. **Community Micromanipulated from Dental Plaque**, v. 190, n. 24, p. 8145-8154, 2008.
- CHANUSSOT, C.; ARENAS, R. Folliculitis por Malassezia sp. **Dermatología Revista Mexicana**, v. 50, p. 20-25, 2006.
- CHITRA, M. A.; JAYANTHY, C.; NAGARAJAN, B. Detection and sequence analysis of accessory gene regulator genes of Staphylococcus pseudintermedius isolates. **Veterinary World**, v. 8, n. 7, p. 902-907, 2015.
- COSTA, A. C. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de Origanum vulgare L. E Cinnamomum zeylanicum B. contra bactérias multirresistentes**. 2009. 98f. Tese (doutorado

em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos) - Universidade Federal da Paraíba, 2009.

COSTA, G. M. et al. Resistência a antimicrobianos em *Staphylococcus aureus* isolados de mastite em bovinos leiteiros de Minas Gerais, Brasil. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 80, n. 3, p. 297–302, 2013.

COYNER, K. Otomycosis due to *Aspergillus* spp. in a dog: Case report and literature review. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 6, p. 613-618, 2010.

CREMONESI, P. et al. Development of a multiplex PCR assay for the identification of *Staphylococcus aureus* enterotoxigenic strains isolated from milk and dairy products. **Molecular and Cellular Probes**, v. 19, n. 5, p. 299-305, 2005.

DAL POZZO, M. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, p 667-672, 2011.

DEL RE, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Revista Brasileira de Plantas Medicinai**s, Botucatu, v. 14, n. 2, p. 389-399, 2012.

DIENSTMANN, S. **Revisão sobre otite externa parasitária por *Otodectes cynotis* em cães e gatos, com enfoque no potencial terapêutico da selamectina**. 2010. 28 f. Monografia (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2010.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced. **Journal Agricultural Food Chemistry**, London, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, Apr. 2006.

DRZEWIECKA, D. Significance and Roles of *Proteus* spp. Bacteria in Natural Environments. **Microbial Ecology**, v. 72, n. 4, p.741-758, 2016.

DZIVA, F. et al. First identification of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* strains among coagulase-positive staphylococci isolated from dogs with otitis externa in Trinidad, West Indies. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 5, n. 1, p. 29-170, 2015.

EBANI, V. et al. Antibacterial and Antifungal Activity of Essential Oils against Pathogens Responsible for Otitis Externa in Dogs and Cats. **Medicines**, v. 4, n. 4, p. 21, 2017.

ENRIGHT, M. C. et al. The evolutionary history of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 99, n. 11, p. 7687-7692, 2002.

ESTRELA, T. S. **Resistência antimicrobiana: Enfoque multilateral e resposta brasileira**. Saúde e Política Externa: os 20 anos da Assessoria de Assuntos Internacionais de Saúde (1998-2018), p. 307-327, 2016.

FARKAS, R.; GERMANN, T.; SZEIDEMANN, Z. Assessment of the ear mite (*Otodectes cynotis*) infestation and the efficacy of an imidacloprid plus moxidectin combination in the treatment of otocariosis in a Hungarian cat shelter. **Parasitology research**, v. 101, n. 1, p. 35-44, 2007.

FAZAKERLEY, J. et al. Heterogeneity of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from atopic and healthy dogs. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 6, p. 578-585, 2010.

FERREIRA, V.; PINTO, A. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p. 1829, 2010.

FIGUEIREDO, E. A. P. et al. *Pseudomonasaeruginosa*: frequência de resistência a múltiplos fármacos e resistência cruzada entre antimicrobianos no Recife/PE. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, v. 19, n. 4, p. 421-427, 2007.

FINHLER, S. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil) sobre agentes infecciosos isolados de bovinos acometidos por mastite. In: X JORNADA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E TECNOLÓGICA DA UFFS, **Anais...10.**, 2020.

FREIRE, I. C. M. et al. Atividade antibacteriana de Óleos Essenciais sobre *Streptococcus mutans* e *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 2, p. 372-377, 2014.

FREITAS, V. D. **Atividade antibacteriana do óleo essencial do cravo da Índia (*Syzygium aromaticum*) frente a *Staphylococcus pseudintermedius* resistentes e sensíveis a meticilina isolados de cães com otite externa.** 2019. 71f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá - MT, 2019.

FRITZEN, M.; TORTELLY, R. N.; VONSOWSKI, J. R. T. Aplicação da ozonioterapia em um cão com otite – relato de caso. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v. 1, n. 2, p. 2018.

FROST, L. S. et al. Mobile genetic elements: The agents of open source evolution. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 722-732, 2005.

GHIBAUDO, G.; PEANO, A. Chronic monolateral otomycosis in a dog caused by *Aspergillus ochraceus*. **Veterinary dermatology**, v. 21, n. 5, p. 522-526, 2010.

GREGÓRIO, A. F. D. **Otite externa canina**: Estudo preliminar sobre otalgia e factores associados. 2013. 64 p. Tese (Mestre em Medicina Veterinária) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2013.

GOODALE, E. C. et al. *Aspergillus* otitis in small animals - a retrospective study of 17 cases. **Veterinary Dermatology**, v. 27, n. 1, p. 3-e2, 2016.

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

HECK, M. G. **Produção de compostos antimicrobianos provenientes do metabolismo de *Streptomyces sp.* linhagem 2S.** 2007. 112 p. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2007.

HELANDER, I. M. et al. Characterization of the Action of Selected Essential Oil Componentson Gram-Negative Bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 9, p. 3590-3595, 1998.

HOFFMANN, R. B. Diagnóstico citológico de otite externa em cães. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 5, p. 1693-1701, 2019.

HOSSEINI, J. et al. Effect of treatment with tris-edta/chlorhexidine topical solution on canine pseudomonas aeruginosa otitis externa withorwithoutconcomitanttreatmentwith oral fluoroquinolones. **Slovenian Veterinary Research**, v. 49, n. 3, p. 133-140, 2012.

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

JACOBSON, L. S. Diagnosis and medical treatment of otitis extern in dogs and cats. **Journal of Small Animal Practice**, v. 73, n. 4, p. 162-170, 2002.

KENNIS, R. A. **Feline otitis**: Diagnosis and treatment. *Clinical Dermatology, An Issue of Veterinary Clinics: Small Animal Practice*, E-Book, v. 43, n. 1, p. 51, 2013.

KEREN, I. et al. Persister cells and tolerance to antimicrobials. **FEMS Microbiology Letters**, v. 230, n. 1, p. 13-18, 2004.

KISS, G.; RADVANYI, S. Z.; SZIGETI, G. New combination for the therapy of canine otitis externa I Microbiology of otitis externa. **Journal of Small Animal Practice**, v. 38, n. 2, p. 51-56, 1997.

KNEGT, F. T. G. **Aspectos epidemiológicos e microbiológicos da espécie Staphylococcus pseudintermedius nas piодermites caninas: uma revisão da literatura**. 2019. 39f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialista em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG, Belo Horizonte - MG, 2019.

KORBELIK, J. et al. Analysis of the oticmycobiota in dogs with otitis externa compared to healthy individuals. **Veterinary Dermatology**, v. 29, n. 5, p. 417-e138, 2018.

KUETE, V. **Medicinal spices and vegetables from Africa**: Therapeutic Potential against Metabolic, Inflammatory, Infectious and Systemic Diseases. 1. ed.: Elsevier, 2017. 692p.

KWIL, I.; KAŻMIERCZAKA, D.; RÓŻALSKI, A. Swarming Growth and Resistance of Proteus penneri and Proteus vulgaris Strains to Normal Human Serum. **Heterocycles**, v. 22, n. 2, p. 165-175, 2013.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453-462, 2001.

LEE, G. Y.; YANG, S. J. Comparative assessment of genotypic and phenotypic correlates of Staphylococcus pseudintermedius strains isolated from dogs with otitis externa and healthy dogs. **Comparative immunology, microbiology and infectious diseases**, v. 70, p. 101376, 2020.

LEWINSOHN, EFRAIM et al. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., Poaceae). **Annals of Botany**, v. 81. n. 1. p. 35-39. 1998.

- LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Cândida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, n. 2, p. 197-201, 2006.
- LIMA, R. K. et al. **Composição dos Óleos Essenciais de Anis-estrelado *Illiciumverum* L. e de Capim-limão *Cymbopogoncitratu*s (DC.) Stapf**: Avaliação do Efeito Repelente sobre *Brevicoryne brassicae* (L.) (Homoptera: Aphididae). *BioAssay*, p. 1-6, 2008. Disponível em: <www.bioassay.org.br/articles/3.8>. Data de acesso: 21 de julho de 2022.
- LOPES, B. C. **Formação de Biofilme por *Staphylococcus pseudintermedius***: Uma revisão. 2018. 35f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Medicina Veterinária) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2018.
- MACHADO, M. L. DA. S.; APPELT, C. E.; FERREIRO, L. Dermatofitos e leveduras isolados da pele de cães com dermatopatias diversas. **Acta Scientiae Veterinariae**, v. 32, n. 3, p. 225-232, 2004.
- MACHADO, T. F. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial do capim limão (*Cymbopogoncitratu*s) e sua interação com os componentes dos alimentos. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, Curitiba, v. 33, n. 1, p. 30-38, 2015.
- MADIGAN, M. T. et al. **Microbiologia de Brock**. 14. ed. Porto Alegre: Artmed, 2016, 1032p.
- MANVITHA, K.; BIDYA, B. Review on Pharmacological Activity of Amygdalin. **International Journal of Herbal Medicine**, v. 1, n. 6, p. 5-7, 2014.
- MEGID, J. et al. Otite canina: Etiologia, sensibilidade antibiótica e suscetibilidade animal. **SEMINA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS**, v. 11, n. 1, p. 45, 1990.
- MENEZES, E. A.; CUNHA, M. D. C. S. O.; CUNHA, F. A. Identificação preliminar de algumas espécies do gênero *Cândida* spp. em meio cromógeno: resultados de dois anos de um estudo multicêntrico realizado no Ceará. **Revista de Patologia Tropical**, v. 40, n. 4, p. 297-303, 2012.
- MIOTTO, F. **Estudo da resistência do *Streptococcus pneumoniae* à penicilina em pneumopatia infecciosas nas cidades de Porto Alegre e Caxias do Sul (RS - Brasil)**. 2001. 66f. Dissertação (Mestrado em Medicina: Pneumologia) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2001.
- MUELLER, E. N. **Avaliação e tratamento da otite externa canina**. 2009. 93f. Dissertação (Mestre em Sanidade Animal Clínica Médica de Pequenos Animais) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2009.
- MURPHY, K. M. A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. **Clinical techniques in small animal practice**, v. 16, n. 3, p. 236-241, 2001.
- NCCLS. **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada**. ANVISA.v. 23,n. 1, 2003.

- NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada.** ANVISA.v. 22,n. 15, 2002.
- NETTO, H. A. Estudo clínico e microbiológico de otite externa de cães. **Acta Veterinária Brasília**, v. 5, n. 1, p. 61-67, 2011.
- NEVES, R. C. S. M. et al. Teste in vitro do efeito acaricida do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* sobre *Otodectes cynotis*. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 20, n. 1, p. 9-12, 2013.
- NOCERA, F. P. et al. Detection of a novel clone of *Acinetobacter baumani* in isolated from a dog with otitis externa. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, p. 101-471, 2020.
- OCHOA, S. A. et al. Características patogénicas de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* resistentes a carbapenémicos, asociadas com laformación de biopelículas. **Boletín Médico del Hospital Infantil de Mexico**, v. 70, n. 2, p. 138-150, 2013.
- OLIVEIRA, L. C. et al. Susceptibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas de otite externa em cães. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 57, n. 3, p. 405-408, 2005.
- OLIVEIRA, L. C. et al. Perfil de isolamento microbiano em cães com otite média e externa associadas. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 58, n. 6, p.1009-1017, 2006.
- OLIVEIRA, T. R. **Avaliação da toxicidade “in vivo”, atividade antifúngica e efeito anti-proliferativo do óleo essencial de *Melaleuca* spp. (*Teatree*, *Cajuput* e *Naiuli*) sobre espécies do gênero *Cândida*.** 2019. 82 f. Tese (Doutorado em Biologia Bucal) - Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba - SP, 2019.
- OLIVEIRA, V. B. et al. Etiologia, perfil de sensibilidade aos antimicrobianos e aspectos epidemiológicos na otite canina: Estudo retrospectivo de 616 casos. **SEMINA: CIÊNCIAS AGRÁRIAS**, v. 33, n. 6, p. 2367-2374, 2012.
- OTERO, J. L.; MESTORINO, N.; ERRECALDE, J. O. Enrofloxacin: na fluorquinolona de uso exclusivo en veterinaria parte I: química, mecanismo de acción, actividad antimicrobiana y resistencia bacteriana. **Analecta Veterinaria**, v. 21, n.1, p. 31-41, 2001.
- PALLERONI, N. J.; NORTH CALDWELL, R. ***Pseudomonas***. *Bergey's Manual of Systematics of Archea and Bacteria*, p. 1-1, 2015.
- PERINI, S. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina.** 2013. 70f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.
- PETROV, V. et al. Otitis externa in dogs: microbiology and antimicrobial susceptibility. **Revue de Medecine Veterinaire**, v. 164, n. 1, p. 18-22, 2013.

POSSEBON, K. F.; KAISER, T. S.; MARTINS, L. R. V. **Agentes microbianos isolados de otite externa em cães**. XXIII SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 2015. Seminário do Conhecimento - Unijuí, 2015.

QUINN, P. J. et al. **Microbiologia Veterinária e Doenças Infecciosas**. Porto Alegre, Brasil: Artmed, 2005. 507p.

RAINA, V. K. et al. Essential oil composition of *Syzygiumaromaticum* leaf from Little Andaman, India. **Flavour and fragrance jornal**, v. 16. n. 5. p. 334-336. 2001.

RAVINDRAN, P. N.; NIRMAL-BABU, K.; SHYLAJA, M. (Ed.). **Cinnamon and cassia: Tthe genus Cinnamomum**. CRC press, 2003. 384p.

ROCHA, B. C. A. **Extração e caracterização do óleo essencial de tomilho (Thymusvulgaris)**. 2013. 91f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) Instituto de Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica - RJ, 2013.

ROSSI, C. C.; PEREIRA, M. F.; GIAMBIAGI-DEMARVAL, M. Underrated staphylococcus species and their role in antimicrobial resistance spreading. **Genetics and Molecular Biology**, v. 43, n. 1, p. 1-10, 2020.

SANTOS, A. L. et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, dec/2007.

SANTOS, J. P. et al. Effectiveness of tobramycin and ciprofloxacinagainstbacterialisolates in canineotitis externa in Uberaba, Minas Gerais. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. 8-9, 2019.

SCHAFFER, J. N.; PEARSON, M. M. Proteus mirabilis and Urinary Tract Infections. **Microbiol Spectr**. v. 3, n. 5, 2015.

SERRACARBASSA, P. D.; DOTTO, P. Endoftalmite por Candida albicans. **Arquivos Brasileiros de Oftalmologia**, v. 66, p. 701-707, 2003.

SILVA, C. B. et al. Antifungal activity of the lemongrass oil and citral against Candida spp. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 12. n. 1. p. 63-66. 2008.

SILVA, C. Z. **Identificação e susceptibilidade de bactérias isoladas de otite externa em cães aos antimicrobianos**. 2014. 38f. Trabalhos de Conclusão de Curso de Graduação (Graduação em Medicina Veterinária) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2014.

SILVA, F. F. P.; SANTOS, M. A. A.; SCHMIDT, V. Resistência a antimicrobianos de Escherichia coli isolada de dejetos suínos em esterqueiras. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 60, n. 3, p. 762-765, 2008.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. 75f. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada). Botucatu (SP): Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, 2010.

SILVA, S. R. S. et al. Efeito do estresse hídrico sobre características de crescimento e a produção de óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Acta Scientiarum. Agronomy**, Maringá, v. 24, n. 5, p. 1363-1368. 2002.

SILVA V. V.; DÍAZ J. M. C.; FEBRÉ, N. Vigilancia de la resistencia de levaduras a antifúngicos. **Revista Chilena de Infectología**, v. 19, p. 149-156, 2002.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**, v. 57, n. 5, p. 589-594, 2010.

SIM, J. X. F. et al. Antimicrobial effects of cinnamon essential oil and cinnamaldehyde combined with EDTA against canine otitis externa pathogens. **Journal of Applied Microbiology**, v. 127, n. 1, p. 99-108, 2019.

SINGH, N.; PATERSON, D. L. Aspergillus infections in transplant recipients. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 18, n. 1, p. 44-69, 2005.

SNYDER, L.; CHAMPNESS, W. **Molecular genetics of bacteria**. American Society of Microbiology: Washington, D. C. 3 ed. 2007. 650p.

SOUSA, C. A. et al. O uso de óleos essenciais no tratamento da malassezíase de cães e gatos: Revisão. **Pubvet**, v. 15, n. 2, p. 1-11, 2021.

SOUZA, V. C.; OLIVEIRA, J. A. A.; CORTEZ, A. C. A. **Identificação das espécies de Malassezia spp. mantidas na Coleção de Microrganismos de Interesse Médico**. INPA, 2007

SOCIEDADE DE PEDIATRIA DE SÃO PAULO - SPSP. **Atualização de Condutas em Pediatria**. n. 11, 2013.

TAYLOR, T. A.; UNAKAL, C. G. **Staphylococcus aureus**. Europe PMC, 2019.

TEIXEIRA, M. G. F. et al. Diagnóstico citológico de otite externa em cães. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, p. 1693-1701, 2019.

THEELEN, B. et al. Malassezia ecology, pathophysiology, and treatment. **Medical Mycology**, p. 10-25, 2018.

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

VIEIRA, R. G.; COUTINHO, S. D. A. Phenotypical characterization of Candida spp. isolated from crop of parrots (Amazona spp.). **Pesquisa Veterinária Brasileira**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 6, p. 452-456, 2009.

ZUR, G.; LIFSHITZ, B.; BDOLAH-ABRAM, T. The association between the signalment, common causes of canine otitis externa and pathogens. **The Journal of Small Animal Practice**, Oxford, v. 52, n. 5, p. 254 - 258, 2011.

ANEXOS

ANEXO 1:

UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

Cx.P.3037 - Lavras - MG - 37200-000 - (35) 3829-5182 cba@nintec.ufla.br

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Otite canina em animais de abrigo Municipal: etiologia e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos", protocolo nº 029/21, sob a responsabilidade de Geraldo Márcio da Costa, Carlos Artur Lopes Leite, Marina Romano de Oliveira, Bianca Rocha Teixeira e Daniel Vitor Martiniano, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto homem), para fins de ensino e/ou pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas edificadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), do Ministério da Ciência, Tecnologia e Inovação (MCTI), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUÁ) da Pró-Reitoria de Pesquisa/UFLA, em 01/08/2021.

Vigência da autorização: de 01/08/2021 a 31/12/2021

Finalidade: () Ensino (x) Pesquisa Científica

Espécie/linhagem/raça: Cão / SRD

Número de animais aprovados: 250 (125 machos e 125 fêmeas)

Peso/Idade: 10-30 kg / adulto

Sexo: macho e fêmea

Origem dos animais (documento apresentado pelo pesquisador responsável e arquivado pela CEUA): Parque São Francisco de Assis localizado na BR 265, Km 341, 980 - Bairro Aeroporto - Responsável: Dra. Amélia Margarida de Oliveira, CRMV: MG 13569.

Rafael Neodini Remedio

Prof. Rafael Neodini Remedio
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animais CEUA

Universidade Federal de Lavras
Pró-Reitoria de Pesquisa /Comissões Permanentes
Campus Universitário -
Caixa Postal 3037 / CEP 37200 000 - Lavras, MG - Brasil
Tel.: +55 (35) 3829 5182
cba@nintec.ufla.br - www.prp.ufla.br

ANEXO 2:**FICHA DE IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL**

| | |
|-----------------------|--------------------------|
| Nome: | Sexo: |
| Idade aproximada: | Tempo de abrigo: |
| Tempo de enfermidade: | Histórico de tratamento: |
| Número baia: | |

SINAIS CLÍNICOS DE OTITE

| | | | |
|-----------------------------------|--|----------------------|--|
| Prurido no pavilhão auditivo | | Inchaço | |
| Marcas de arranhadura no pavilhão | | Odor | |
| Cabeça pendular | | Presença de secreção | |
| Meneio cefálico | | Presença de cerúmen | |
| Rubor | | Corpo estranho | |
| Dor | | Otohematoma | |
| Linfadenopatia | | Febre | |

RESENHA DO ANIMAL:

| |
|--|
| |
|--|

FOTO DO ANIMAL:

| |
|--|
| |
|--|

ANEXO 3:

Resultados dos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) dos óleos essenciais frente aos isolados de *Staphylococcus Coagulase Positivos* (SCP).

| Número de isolados frente à concentração do óleo essencial | | | | | |
|---|------------------|----------------|--------------------|---------------|--------------|
| CIMs SCP | Melaleuca | Tomilho | Capim Limão | Canela | Cravo |
| 5% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 2,5% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 1,25% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| 0,63% | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 |
| 0,32% | 0 | 3 | 1 | 1 | 1 |
| 0,16% | 2 | 9 | 6 | 18 | 0 |
| 0,08% | 2 | 8 | 5 | 0 | 6 |
| 0,04% | 5 | 2 | 0 | 0 | 16 |
| 0,02% | 6 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| >5% | 8 | 0 | 10 | 4 | 0 |

ANEXO 4:

Resultados dos ensaios de concentração inibitória mínima (CIM ou MIC) dos óleos essenciais frente aos isolados de *Staphylococcus Coagulase Negativos* (SCN).

| Número de isolados frente à concentração do óleo essencial | | | | | | |
|---|------------------|----------------|--------------------|---------------|--------------|--|
| CIMs SCN | Melaleuca | Tomilho | Capim Limão | Canela | Cravo | |
| 5% | 0 | 0 | 1 | 0 | 0 | |
| 2,5% | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | |
| 1,25% | 0 | 0 | 0 | 4 | 1 | |
| 0,63% | 0 | 1 | 6 | 8 | 0 | |
| 0,32% | 6 | 3 | 4 | 7 | 1 | |
| 0,16% | 1 | 11 | 6 | 0 | 1 | |
| 0,08% | 8 | 5 | 0 | 0 | 8 | |
| 0,04% | 4 | 0 | 0 | 0 | 8 | |
| 0,02% | 0 | 1 | 0 | 0 | 1 | |
| >5% | 2 | 0 | 10 | 1 | 0 | |