



Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA)  
Programa de Pós-Graduação em Ambiente, Tecnologia e Sociedade (PPGATS)

**EFICÁCIA ANTIBACTERIANA *IN VIVO* DA SOLUÇÃO  
OTOLÓGICA À BASE DE *Spondias mombin* L. NO  
TRATAMENTO DE OTITE EXTERNA EM CÃES**

JONAS DOS SANTOS SILVA

Mossoró / RN  
Julho de 2021

JONAS DOS SANTOS SILVA

**EFICÁCIA ANTIBACTERIANA *IN VIVO* DA SOLUÇÃO OTOLÓGICA À BASE  
DE *Spondias mombin* L. NO TRATAMENTO DE OTITE EXTERNA EM CÃES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ambiente, Tecnologia e Sociedade.

Orientador: Prof. Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó - UFERSA

Co-orientador (a): Prof<sup>a</sup>. Dra. Nilza Dutra Alves - UFERSA

Mossoró / RN  
Julho de 2021

© Todos os direitos estão reservados a Universidade Federal Rural do Semi-Árido. O conteúdo desta obra é de inteira responsabilidade do (a) autor (a), sendo o mesmo, passível de sanções administrativas ou penais, caso sejam infringidas as leis que regulamentam a Propriedade Intelectual, respectivamente, Patentes: Lei nº 9.279/1996 e Direitos Autorais: Lei nº 9.610/1998. O conteúdo desta obra tomar-se-á de domínio público após a data de defesa e homologação da sua respectiva ata. A mesma poderá servir de base literária para novas pesquisas, desde que a obra e seu (a) respectivo (a) autor (a) sejam devidamente citados e mencionados os seus créditos bibliográficos.

S586e Silva, Jonas dos Santos.  
Eficácia antibacteriana in vivo da solução  
otológica à base de Spondias mombin L. no  
tratamento de otite externa em cães / Jonas dos  
Santos Silva. - 2021.  
79 f. : il.

Orientador: Francisco Marlon Carneiro Feijó.  
Coorientadora: Nilza Dutra Alves.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal  
Rural do Semi-árido, Programa de Pós-graduação em  
Ambiente, Tecnologia e Sociedade, 2021.

1. plantas medicinais. 2. antimicrobiano. 3.  
otite canina. 4. contagem bacteriana. 5.  
citotoxicidade. I. Feijó, Francisco Marlon  
Carneiro, orient. II. Alves, Nilza Dutra, co-  
orient. III. Título.

O serviço de Geração Automática de Ficha Catalográfica para Trabalhos de Conclusão de Curso (TCC's) foi desenvolvido pelo Instituto de Ciências Matemáticas e de Computação da Universidade de São Paulo (USP) e gentilmente cedido para o Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal Rural do Semi-Árido (SISBI-UFERSA), sendo customizado pela Superintendência de Tecnologia da Informação e Comunicação (SUTIC) sob orientação dos bibliotecários da instituição para ser adaptado às necessidades dos alunos dos Cursos de Graduação e Programas de Pós-Graduação da Universidade.

JONAS DOS SANTOS SILVA

**EFICÁCIA ANTIBACTERIANA *IN VIVO* DA SOLUÇÃO OTOLÓGICA À BASE  
DE *Spondias mombin* L. NO TRATAMENTO DE OTITE EXTERNA EM CÃES**

Dissertação apresentada à Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFRSA, Campus de Mossoró, como parte das exigências para a obtenção do título de Mestre em Ambiente, Tecnologia e Sociedade.

Aprovada em: 28 / 07 / 2021.

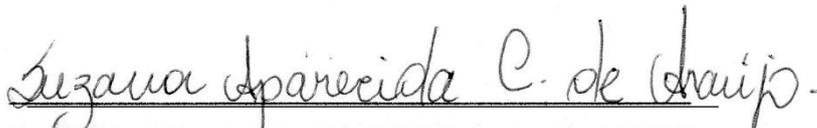
**BANCA EXAMINADORA**

FRANCISCO  
MARLON CARNEIRO  
FEIJO:41688597387

Assinado de forma digital por  
FRANCISCO MARLON CARNEIRO  
FEIJO:41688597387  
Dados: 2021.08.25 09:25:53 -03'00'

---

Prof. Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó - UFRSA  
Presidente da Banca e Orientador



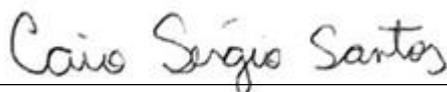
Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Suzana Aparecida Costa de Araújo - UFRPB  
Membro externo ao programa

NILZA DUTRA  
ALVES:42583780387

Assinado de forma digital por NILZA  
DUTRA ALVES:42583780387  
Dados: 2021.08.24 15:05:04 -03'00'

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Nilza Dutra Alves - UFRSA  
Membro interno ao programa



---

Dr. Caio Sérgio Santos - UFRSA  
Membro externo ao programa

Dedico

À minha família, em especial a minha mãe e avó, por acreditarem e investirem sempre em meu desenvolvimento acadêmico. E à todas as pessoas que eu conheci nesse período em Mossoró-RN, cada uma ensinou algo novo e importante para meu crescimento pessoal e profissional.

## AGRADECIMENTOS

Talvez não existam palavras suficientes e significativas que me permitam agradecer a todos com justiça, dando o devido merecimento, mas é tudo que posso fazer, usar palavras para agradecer.

Diante seu olhar generoso sobre mim e sobre a minha vida que eu agradeço primeiramente a Deus por tudo o que eu alcancei até hoje. Eu reconheço o meu esforço e me reconcilio com os meus fracassos, porque sei que nenhum deles foi tão grande o suficiente para me fazer desistir, pelo contrário, os meus erros me ajudaram a crescer.

A toda EQUIPE do laboratório de Microbiologia Veterinária (LAMIV) – UFERSA, aos amigos e mentores Caio Sérgio, Gardênia Rodrigues, Fernando Fernandes, por compartilharem tantas etapas deste projeto comigo. A prof<sup>a</sup>. Ana Carla Suassuna por ter participado de minha qualificação e contribuído para a continuidade deste trabalho. A prof<sup>a</sup>. Nilza Dutra Alves, pela maravilhosa capacidade de inspirar seus alunos a aprenderem e os ensinar a pensarem por si mesmos. A Prof<sup>a</sup>. Suzana Aparecida Costa de Araújo por contribuir neste momento tão importante de minha vida. A todos os professores das disciplinas do PPGATS que passaram por minha vida, me apresentando o mundo docente que contribuiu para a minha formação como profissional e como ser humano. Em especial, ao Prof. Francisco Marlon Carneiro Feijó pela oportunidade, pelo apoio em tudo, pela dedicação comigo e com o projeto, por cada conselho e bronca e por me guiar pelos conhecimentos sobre as plantas medicinais e o mundo da Microbiologia, o senhor foi mais que um orientador, foi um pai.

Aqueles que mesmo longe, sempre estiveram tão perto de mim.

E por fim... Mas não menos importante... A Minha mãe, Ana Maria dos Santos Silva, e minha avó, Maria da penha dos Santos Silva, que sempre fizeram do sacrifício de suas próprias vidas o impossível para o meu crescimento intelectual e moral.

## EFICÁCIA ANTIBACTERIANA *IN VIVO* DA SOLUÇÃO OTOLÓGICA À BASE DE *Spondias mombin* L. NO TRATAMENTO DE OTITE EXTERNA EM CÃES

### RESUMO

Estudos mostram que a *Spondias mombin* L. (SM) possui bioativos com potencial antimicrobiano, os quais podem ser utilizados de forma alternativa na medicina veterinária, sendo uma opção em casos de infecções caninas com bactérias multiresistentes. Dessa forma, objetivou-se com esse trabalho avaliar a eficácia antibacteriana *in vivo* da solução otológica à base de folhas de SM no tratamento de otite externa em cães. Foram utilizados 20 animais, independente de sexo, raça e idade, que apresentavam casuística de otite, os quais foram divididos em quatro grupos de 5 animais, submetidos a ação da solução teste a base de SM (2% - glicerinado e aplicado de 12/12h; 2% - glicerinado e aplicado de 24/24h; 20% aplicado de 12/12h) e controle positivo ciprofloxacina a 3,5%, avaliados aos 7, 14 e 21 dias após início do tratamento. Em cada grupo foi colhida secreção otológica com auxílio de suabes e feita avaliação da quantidade bacteriana de acordo com a técnica de diluição em série ( $10^1$  à  $10^4$ ), semeada em ágar Plate Count, em duplicata. Os microrganismos isolados no início dos tratamentos foram submetidos a análise morfotintorial e provas bioquímicas para conclusão de seu gênero/espécie e identificação da sua resistência aos antibióticos (antibiograma). Os sinais clínicos (prurido, dor, hiperpigmentação, hiperqueratose, eritema, descamação e exsudato) do conduto auditivo foram avaliados por meio de *check list* (0, 7, 14 e 21 dias) atribuindo escores que variaram de 0 (ausência de sintomatologia) a +5 (nível crítico de sintomatologia) para determinação macroscópica da eficácia dos tratamentos. Foi feita a avaliação da citotoxicidade da planta com uso de fragmento da pele ( $9,0\text{mm}^3$ ) canina, divididas em quatro grupos e incubadas por 12h para cada grupo: a) Sem a presença de extrato; b) Extrato de cajá a 20%; c) Extrato de cajá a 2%; d) solução de ciprofloxacina a 3,5%, analisando morfologia, viabilidade e atividade metabólica celular. A estatística descritiva foi associada ao número e percentual de espécies e resistência bacteriana. Quanto a quantificação de bactéria, citotoxicidade e aos sinais clínicos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e sendo constatado significância entre os tratamentos foi aplicado o teste de comparação de médias (Tukey a 5%) com o programa estatístico SISVAR 5.6. Para a citotoxicidade, os dados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão de quatro repetições, usando o software GraphPad (Graph-Pad Software Incorporation, La Jolla, CA, USA), os resultados foram verificados para normalidade pelo teste Shapiro-Wilk e homoscedasticidade pelo teste de Levene. No teste *in vitro* (antibiograma), das 33 cepas bacterianas isoladas, 32 mostraram resistência a pelo menos um antimicrobiano e 9 foram resistentes a três ou mais diferentes antimicrobianos. Quanto aos sinais clínicos, os escores referentes ao prurido, dor, hiperpigmentação, descamação, eritema e exsudato no tratamento com a SM (2% - glicerinado e a 20% aplicados de 12/12h) foram semelhantes ao controle positivo ( $p < 0,05$ ). Concluindo que a solução otológica de SM a 2% com glicerina (12/12h) apresenta tendência como fitoterápico alternativo para diminuição da contagem bacteriana e dos sinais clínicos em otite de cães.

**PALAVRAS-CHAVE:** plantas medicinais, antimicrobiano, otite canina, contagem bacteriana, citotoxicidade.

## IN VIVO ANTIBACTERIAL EFFECTIVENESS OF *Spondias mombin* L. BASED OTOLOGICAL SOLUTION IN THE TREATMENT OF EXTERNAL OTITIS IN DOGS

### ABSTRACT

Studies show that *Spondias mombin* L. (SM) has bioactives with antimicrobial potential, which can be used alternatively in veterinary medicine, being an option in cases of canine infections with multiresistant bacteria. Thus, the aim of this study was to evaluate the in vivo antibacterial efficacy of the otological solution based on SM leaves in the treatment of otitis externa in dogs. Twenty animals were used, regardless of sex, race and age, which presented a series of otitis, which were divided into four groups of 5 animals, submitted to the action of the test solution based on SM (2% - glycerin and applied 12/ 12h; 2% - glycerin and applied 24/24h; 20% applied 12/12h) and positive control ciprofloxacin 3.5%, evaluated at 7, 14 and 21 days after the start of treatment. In each group, ear secretion was collected with the aid of swabs and the bacterial quantity was evaluated according to the serial dilution technique ( $10^1$  to  $10^4$ ), seeded in Plate Count agar, in duplicate. The microorganisms isolated at the beginning of the treatments were submitted to morphotintorial analysis and biochemical tests to conclude their genus/species and identification of their resistance to antibiotics (antibiogram). Clinical signs (itching, pain, hyperpigmentation, hyperkeratosis, erythema, desquamation and exudate) of the auditory meatus were assessed using a checklist (0, 7, 14 and 21 days) attributing scores ranging from 0 (absence of symptoms) to +5 (critical level of symptomatology) for macroscopic determination of treatment efficacy. The evaluation of the plant's cytotoxicity was carried out using a canine skin fragment (9.0mm<sup>3</sup>), divided into four groups and incubated for 12h for each group: a) Without the presence of extract; b) 20% caja extract; c) 2% caja extract; d) 3.5% ciprofloxacin solution, analyzing cell morphology, viability and metabolic activity. Descriptive statistics were associated with the number and percentage of species and bacterial resistance. As for the quantification of bacteria, cytotoxicity and clinical signs, they were submitted to analysis of variance (ANOVA) and when significance was found between treatments, the mean comparison test (Tukey 5%) was applied with the statistical program SISVAR 5.6. For cytotoxicity, data were expressed as mean  $\pm$  standard error of four replications, using the GraphPad software (Graph-Pad Software Incorporation, La Jolla, CA, USA), the results were checked for normality by the Shapiro-Wilk test and homoscedasticity by the Levene's test. In the in vitro test (antibiogram), of the 33 bacterial strains isolated, 32 showed resistance to at least one antimicrobial and 9 were resistant to three or more different antimicrobials. As for clinical signs, the scores for itching, pain, hyperpigmentation, desquamation, erythema and exudate in the treatment with MS (2% - glycerin and 20% applied at 12/12h) were similar to the positive control ( $p < 0, 05$ ). Concluding that the 2% SM otologic solution with glycerin (12/12h) has a tendency as an alternative herbal medicine to decrease bacterial counts and clinical signs in dog otitis.

**Key words:** medicinal plants, antimicrobial, canine otitis, bacterial count, cytotoxicity.

## LISTA DE ABREVIATURAS

AgNPs – Nanopartículas de Prata

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

CEUA – Comitê de Ética com Uso de Animais

CFU – Colony Forming Unit

CIPRO – Ciprofloxacina

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

EHEC – *Escherichia coli* enterohemorrágica

EM – extracellular matrix

EPEC – *Escherichia coli* enteropatogênica

ESBL – *Extended-Spectrum  $\beta$ -lactamase*

ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*

EUA – Estados Unidos da América

GLY – Glicerina

H<sub>2</sub>S – Sulfeto de Hidrogênio

HV – Hospital Veterinário

ICE – Elemento Integrativo e Conjugativo

IL – Interleucina

LAMIV – Laboratório de Microbiologia Veterinária

LRD – Laboratório Regional de Diagnóstico

MIC – Minimum Inhibitory Concentration

NaCl – Cloreto de Sódio

NGF – Fator de Crescimento do Nervo

OMS – Organização Mundial da Saúde

PBPs – *Protein Binding Penicilin*

pH – Potencial Hidrogeniônico

PNPIC – Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares

PNPMF – Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos

RN – Rio Grande do Norte

RNA – Ácido Ribonucleico

SIC – Inibidor da lise mediada pelo complemento

SM – *Spondias mombin* L.

SNC – Sistema Nervoso Central

spp. – Espécies

StCN – *Staphylococcus* coagulase negativa

SUS – Sistema Único de Saúde

TNF – Fator de Necrose Tumoral

UENP – Universidade Estadual do Norte do Paraná

VRSA – *Vancomycin Resistant Staphylococcus aureus*

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** – Uso popular das partes da planta *Spondias mombin* L. de acordo com regiões p.21

### **Capítulo 1 – *In vivo* antibacterial effectiveness of the otological solution based on *Spondias mombin* L. in the treatment of external otitis in dogs.**

**Table 1** – Number and percentage of microorganisms isolated from dogs with otitis treated with SM decoction at 2% or 20% or with ciprofloxacin at 3.5%..... p. 64

**Table 2** – Number and percentage of antimicrobial resistances among bacteria isolated from dogs with otitis treated with SM decoction at 2% or 20% or with ciprofloxacin at 3.5%..... p. 65

**Table 3** – Genera of bacteria isolated and their antimicrobial resistance profiles..... p. 66

**Table 4** – Viability of epithelial cells grown *in vitro* with SM decoction at different concentrations (2% and 20%) and ciprofloxacin 3.5%..... p. 68

**Table 5** – Metabolic activity of epithelial cells grown *in vitro* with SM decoction at different concentrations (20% and 2%) and ciprofloxacin at 3.5%..... p. 69

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Cajazeira (*Spondias mombin* L.): A) Árvore; B) Folhas e C) Frutos .....p. 21
- Figura 2** – Cão com otite externa bacteriana em conduto auditivo: A) Ausência de secreção; B) Secreção seruminolítica; C) Secreção mucopurulenta)..... p. 25
- Figura 3** – Estrutura química da ciprofloxacina ..... p. 37
- Figura 4** – Estrutura química da tobramicina..... p. 38
- Capítulo 1 – *In vivo* antibacterial effectiveness of the otological solution based on *Spondias mombin* L. in the treatment of external otitis in dogs.**
- Figura 1** – Average microbial count (log CFU g/L) in samples from the auricular pavilion of dogs with otitis treated with *Spondias mombin* L. (SM) decoction and ciprofloxacin (CIPRO) at days 0, 7, 14, and 21. .... p. 67
- Figura 2** – Morphological evaluation of epithelial cells exposed to 20% SM decoction 2% SM decoction, and ciprofloxacin 3.5%. A) Negative control, B) 20% SM decoction, C) 2% SM decoction, D) ciprofloxacin 3.5%. Scale bar = 100  $\mu\text{m}$ ; 100 $\times$  magnification..... p. 68
- Figura 3** – Mean scores for clinical signs observed in dogs treated with *Spondias mombin* L. decoction and ciprofloxacin for 21 days. <sup>a,b</sup>: Different letters (next to the mean values) indicate statistically significant differences (p < 0.05)..... p. 70

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	14
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	16
2.1. FITOTERAPIA .....	16
2.2. ETNOBOTÂNICA E ETNOVETERINÁRIA .....	18
2.3. <i>Spondias mombin</i> L .....	20
<b>2.3.1 Característica fitoquímica</b> .....	22
<b>2.3.2. Aplicações de <i>Spondias mombin</i> L. <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i></b> .....	23
2.4. OTITE CANINA.....	24
<b>2.4.1. Agentes etiológicos bacterianos em otites</b> .....	27
2.4.1.1. <i>Staphylococcus</i> spp. ....	28
2.4.1.2. <i>Streptococcus</i> spp.....	29
2.4.1.3. <i>Enterococcus</i> spp.....	30
2.4.1.4. <i>Stomatococcus</i> spp. ....	31
2.4.1.5. <i>Proteus</i> spp.....	32
2.4.1.6. <i>Citrobacter freundii</i> .....	32
2.4.1.7. <i>Pantoea agglomerans</i> .....	33
2.4.1.8. <i>Enterobacter</i> spp. ....	34
2.5. ANTIMICROBIANOS.....	35
2.6. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA .....	39
<b>2.6.1. Resistência em cocos gram-positivos</b> .....	39
<b>2.6.2. Resistência em bacilos gram-negativos</b> .....	41
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	45
<b>3. OBJETIVOS</b> .....	58
3.1. OBJETIVO GERAL.....	58
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	58
<b>4. CAPÍTULO 1</b> .....	59
<b>5. CONCLUSÃO</b> .....	75
<b>APÊNDICES</b> .....	76
<b>ANEXOS</b> .....	78

## 1. INTRODUÇÃO

A otite é caracterizada como um processo inflamatório e infeccioso do conduto auditivo que acomete com grande frequência cães de todas as raças e idades, sendo uma das desordens mais comuns do conduto auditivo de cães na clínica veterinária (TEIXEIRA et al., 2019). Os animais podem apresentar sinais clínicos variados, porém, os mais observados são hiperemia, inflamação, prurido, exsudato e dor (PERRY et al., 2017). Esta enfermidade pode se originar por diversos fatores como: excesso de umidade do conduto auditivo, raças com pré-disposição, atopia, tratamentos medicamentosos inadequados, traumas otológicos, fatores anatômicos e conformacionais do ouvido, dentre outros. Tais fatores são agravados perante a presença de microrganismos (bactérias) multirresistentes que dificultam e/ou impedem a resolução do tratamento (SANTOS, GUIMARÃES, 2020).

Tem-se aumentado em otites o índice da resistência de microrganismos aos antimicrobianos usados no cotidiano da clínica médica veterinária (BOURÉLY et al., 2019), isto ocorre por que os plasmídeos bacterianos de resistência antimicrobiana permitem que as bactérias se desenvolvam rapidamente no ambiente e ainda transmitam genes que codificam características adaptativas as gerações seguintes (ORLEK et al., 2017).

Outro fator está associado à toxicidade dos agentes terapêuticos alopáticos sobre organismos ambientais devido a concentrações ecossistêmicas elevadas e seus efeitos combinados e sinérgicos (MEZZELANI, GORBI, REGOLI, 2018). Os descartes incorretos no meio ambiente levam a contaminação de recursos hídricos e provocam o desenvolvimento de diversas doenças nos organismos ambientais (Homem, animal, planta, microrganismo) através da sua ingestão em cadeia, que por sua vez acaba com microrganismos sensíveis, deixando vivos apenas os mais resistentes (BALBINO, BALBINO, 2017).

De forma alarmante, pesquisas científicas identificaram que a resistência antimicrobiana na população humana, principalmente em tutores de animais de companhia e até mesmo em veterinários, pode estar associada a microrganismos de origem canina. Sendo assim, um risco à saúde pública que exige o uso prudente de antimicrobianos para proteger os humanos como buscar abordagens alternativas para tratar infecções em animais (CHAN et al., 2019).

Mesmo com o avanço da tecnologia e investimentos das indústrias farmacêuticas em elaborar medicamentos antibióticos cada vez mais potentes, cresce os índices de resistência microbiana. O uso de bioativos das plantas com propriedade terapêutica vem aumentando no Brasil, e segundo a Organização Mundial de Saúde, estas poderão ser o melhor recurso para se

obter uma variedade de drogas. Embora, seu uso não deva ser feito de forma empírica, mas baseado em estudos quanto a eficácia e toxicidade (CHAN et al., 2019).

Dentre as plantas medicinais tem-se a *Spondias mombin* L. (cajá), que vem recebendo credibilidade da ciência devido seu amplo espectro funcional oriundo da cultura popular.

A *Spondias mombin* L. (SM) é uma planta medicinal de uso popular e na etnoveterinária, tida como uma matéria prima de potencial terapêutico graças aos seus bioativos, desempenhando atividade antibacteriana (quercetina, rutina e derivados do ácido anarcádico), antioxidante (compostos fenólicos, vitamina C e carotenoides), antiparasitária (taninos e flavonoides), antiinflamatória e antiviral (geranina e galiolgeranina), moluscicida (derivados do ácido salicílico), antifúngica e hipocolesterolmiante (aglicona ou sapogenina), e leishmanicida (galiotaninos) (SOUZA, DINIZ, 2018; FERNANDES et al., 2019).

Considerando o uso desta espécie com potencial antimicrobiano alternativo para uso na medicina veterinária, o presente estudo investigou a eficácia antibacteriana da solução otológica à base de folhas de cajá (*Spondias mombin* L.) no tratamento das otites externas em cães.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1. FITOTERAPIA

A Fitoterapia é a ciência que estuda o uso de plantas ou parte delas para tratamento de enfermidades, dela podem ser elaborados medicamentos fitoterápicos das mais diversas formulações para uso como chás, unguentos, soluções, pastas, dentre outros (BOHNEBERGER et al., 2019), sendo um recurso muito valioso e procurado pelo homem que encontrou na natureza uma forma de melhorar a sua qualidade de vida. A evolução do conhecimento sobre os fitoterápicos e seus bioativos deram origem ao uso de novas substâncias moleculares, proveniente graças a biossíntese que é a maior responsável pela formação, acúmulo e degradação destas diversas substâncias orgânicas intracelulares que fazem parte dos tecidos dos organismos animal e vegetal (MARQUES et al., 2019).

Apesar da eficácia e baixo custo operacional, a fitoterapia não apresenta aplicação uniforme em todo o país, além de ainda ser um tópico muitas vezes desconhecido pelos profissionais de saúde. As dificuldades surgem já no diferencial entre medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais, tais definições são confundidas tanto pela população quanto por profissionais de saúde. Segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as plantas medicinais são aquelas utilizadas pelas comunidades com finalidade terapêutica, com sua eficácia sendo comprovada até os dias atuais através de estudos químicos e farmacológicos. Já os medicamentos fitoterápicos são obtidos pela extração de matérias primas bioativas, que passam por um procedimento de industrialização e garantem eficácia baseada em evidências clínicas (ESTEVES, 2020).

Segundo Giordani et al. (2016), as plantas medicinais são promissoras para o desenvolvimento de fármacos. Nos últimos anos foram implementadas pelo governo políticas e programas visando o treinamento da sociedade para cultivo, coleta, processamento, armazenamento, manipulação e aplicação das plantas medicinais.

Desde o início da civilização, o homem sempre buscou na natureza, alternativas para a cura e/ou alívio das doenças, com o objetivo de melhorar sua qualidade de vida, e assim, aumentar suas chances de sobrevivência (ALENCAR et al., 2019).

O registro dos primeiros fitoterápicos aconteceu na China em 2838-2698 a.C., descritos pelo imperador Shen Nung, onde citou 365 plantas medicinais (CUNHA, 2021). Na Bíblia, descrito no Antigo e no Novo Testamento, há muitas referências sobre plantas curativas ou seus derivados (o benjoim e a mirra) (CUNHA, 2021). Na Grécia e Roma antigas, a alfazema era uma das ervas utilizada nos banhos, e também no processo de mumificação no Egito. Desde

muito tempo, o alho, por exemplo, exerce importante papel seja na culinária ou na medicina, tendo sua origem provavelmente da Sicília ou na Ásia Ocidental, é utilizado há mais de cinco mil anos pelos árabes, hindus e egípcios. Na Europa, ervas são usadas por vários séculos, atualmente a maior parte delas está patenteada e prescrita. China e Índia também possuem vasta experiência no uso de plantas para tratamento terapêutico, embora a eficácia da maioria delas ainda não tenha comprovação farmacológica, as plantas medicinais são parte importante na sua cultura milenar de medicina. Nos Estados Unidos da América - EUA, as pessoas fazem muito uso de terapias alternativas, com mais de um terço da população americana como usuária de ervas para fins de saúde. Na América Latina, estudos demonstram o uso de plantas medicinais tanto em zonas rurais como até mesmo nas metrópoles (BRANDÃO et al., 2006).

De acordo com Coelho e Júnior (2015), o surgimento no Brasil de uma medicina popular com o uso das plantas medicinais, deve-se aos índios, com contribuições dos negros e europeus, no período em que era colônia de Portugal. O Conhecimento tradicional na utilização destas plantas, segundo Niehues et al. (2011), destaca-se justamente pelo fato de mesmo com o surgimento de novos conhecimentos ao longo das décadas, ainda existem pessoas de diversas regiões e culturas que fazem uso de plantas como principal forma para cura das enfermidades.

Isso demonstra que possuem um papel importante na abordagem terapêutica atual, porém, muitas pessoas fazem uso de plantas que não apresentam ainda uma eficácia e segurança comprovadas, isso ocorre pelo excesso de confiança nos relatos dos seus antecessores, conhecimento este, passado de geração para geração sobre os benefícios alcançados com o uso das plantas para o tratamento de várias doenças (GRIBNER, RATTMANN, GOMES, 2019).

Com o propósito de fortalecer a utilização de plantas medicinais o Governo Nacional Brasileiro instituiu, em 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF). O objetivo foi de garantir a população brasileira o acesso a plantas medicinais e drogas vegetais através de seu uso racional e seguro, favorecendo a sustentabilidade da biodiversidade brasileira (BRASIL, 2006a). Neste mesmo ano, foi aprovada a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) que também integra a fitoterapia como prática complementar no âmbito do Sistema Único de Saúde (SUS) (BRASIL, 2006b). No entanto, surgem alguns desafios para os profissionais da saúde para que ocorra a inserção das plantas medicinais no âmbito sanitário (NIEHUES et al., 2011). O uso de fitoterápicos em animais é uma prática comum, mas não existe ainda uma política pública associada a integração com serviços veterinários. Um serviço para animais poderia ser utilizado através de um programa similar como determina a portaria N° 886, de 20 de abril de 2010, que instituiu Farmácia Viva no âmbito do SUS, favorecendo o uso de fitoterápicos para humanos.

Segundo Zeni et al. (2017), existe uma preferência crescente por produtos de origem natural em vez de sintéticos, porque as pessoas pensam, correta ou incorretamente, que os naturais causam menos efeitos colaterais e consequências indesejáveis. A produção sustentável visa menores impactos ao meio ambiente com a preservação dos recursos naturais para as futuras gerações, resultando com isso um desenvolvimento sustentável. Para Sartori, Latronico e Campos (2014), é crescente o interesse sobre a sustentabilidade, que objetiva estratégias para uma produção mais limpa, consumo sustentável, resíduo zero, entre outros.

O resultado desse processo é que muitos povos conseguiram dominar o conhecimento do uso de plantas e ervas medicinais, substituindo atualmente a alternativa alopática que apresenta, na maioria dos casos, um único princípio ativo responsável pelo seu efeito farmacológico, totalmente diferente dos extratos vegetais que contém multicomponentes bioativos que, muitas das vezes, atuam em alvos farmacológicos diferentes, promovendo assim melhora clínica de várias sintomatologias simultaneamente, e deste modo até hoje, alguns povos ainda fazem uso consciente de medicamentos fitoterápicos tradicionais relacionados com saberes e práticas que foram adquiridas ao longo dos séculos (FERREIRA, PINTO, 2010), caracterizando a base para a etnobotânica.

## 2.2. ETNOBOTÂNICA E ETNOVETERINÁRIA

A Etnobotânica é a área da ciência responsável por estudar a interação entre o homem e as plantas e o modo como essas plantas são usadas como recursos (SOUZA et al., 2020). Sendo assim, permite compreender as formas pelas quais as pessoas classificam, manipulam e utilizam algumas espécies de plantas medicinais. As plantas medicinais são produtos influentes na sociedade por constituírem parte da biodiversidade, muitas são utilizadas de diferentes maneiras e por diversos povos. Mesmo com as sabedorias da medicina atual, o uso das plantas continua sendo o método alternativo de cura, quer seja pelos custos dos medicamentos sintéticos ou da facilidade de acesso da população a elas (NUNES et al., 2020).

A relação das comunidades tradicionais com a natureza, especialmente com as práticas de manejo das plantas medicinais reconhecidas por elas, revela a importância do desenvolvimento sustentável e conservação dos recursos vegetais. Essas populações tendem a preservar os recursos naturais, conseguindo assim adotar o uso sustentável, promover a conservação de seus costumes e perpetuar seus conhecimentos sobre os fitoterápicos. Todos estes benefícios são graças a posse e/ou aquisição de diferentes espécies da flora, para uso em ocasiões de suas necessidades (NUNES et al., 2020).

Os avanços científicos na área de medicamentos alopáticos, no século passado, promoveram o combate a algumas doenças que atingem a humanidade (doenças bacterianas, parasitárias e virais). Entretanto, 80% da população ainda busca medidas terapêuticas alternativas por causa da dificuldade de acesso ao atendimento primário à saúde, seja pela distância para obter os medicamentos alopáticos ou seu alto custo. Desta maneira, os fitoterápicos estão entre os principais recursos terapêuticos que vêm sendo utilizados há muito tempo pela sociedade para seus cuidados com a saúde (NASCIMENTO JÚNIOR et al., 2016).

O uso desses conhecimentos e práticas populares em prol da saúde animal é conhecido como etnoveterinária, que é definida como sendo a ciência que envolve a opinião e o conhecimento popular sobre as plantas medicinais, utilizadas para o tratamento ou prevenção de doenças dos animais (ANDRADE et al., 2019).

No Rio Grande do Norte, algumas comunidades agrícolas de regiões rurais, utilizam as plantas medicinais como alternativa para o tratamento de enfermidades nos animais, muitas delas fazem o uso destas plantas por que dispõem de poucos recursos financeiros para adquirir medicamentos industrializados, além de serem fáceis de obtenção como possuem efeitos suaves, o que pode explicar a redução dos efeitos colaterais, tornando-se uma forma menos agressiva de tratamento dos animais (TÔRRES et al., 2005). E para que a utilização das plantas medicinais no semiárido, visando a saúde animal, sejam mais efetivas e valorizadas, é necessário o desenvolvimento de pesquisas tanto sobre o bioma caatinga, a produção e criação de animais, como também o tratamento das doenças que os acometem utilizando essas plantas medicinais.

Souza (2015) em sua pesquisa sobre o uso de plantas no semiárido, na cidade de Mossoró-RN, descreveu que o uso medicinal em animais foi de aproximadamente 38 espécies, pertencentes a 23 famílias botânicas, informação fornecida por 106 pessoas acima de 18 anos. As famílias de plantas com maiores indicações na pesquisa foram Fabaceae (7 spp.), Euphorbiaceae (4 spp.) e Lamiaceae (3 spp.), tendo as espécies mais citadas: *Heliotropium indicum* L. (Fedegoso), *Ximenia americana* L. (Ameixa-brava) e *Aloe vera* (Babosa), sendo as cascas e as folhas como as partes mais usadas. Tais dados obtidos pelo pesquisador evidenciam que produtores rurais têm acesso e conhecimento a uma ampla variedade de plantas medicinais capazes de suprir diferentes enfermidades que acometem seus animais, como também mesmo com os avanços tecnológicos atuais os indivíduos submetidos a pesquisa apresentaram interesse na utilização de plantas com a finalidade medicinal.

Batista et al. (2017) descreveu as seguintes atividades em animais utilizando fitoterápicos: Batata de purga (*Operculina hamiltonii*) ideal no auxílio e combate das verminoses;

Nim indiano (*Azadirachta indica*); Babosa (*Aloe vera* L.) considerada laxante, analgésico e antibacteriano; Arnica (*Lychnophora ericoides*), indicado para fraturas, lesões, dor nas articulações e cicatrização; Aroeira do sertão (*Myracrodruon urundeuva*) utilizada na limpeza de ferimentos e auxílio na cicatrização; caçatinga (*Croton argyrophylloides* Muell. Arg.), hortelã miúdo (*Mentha piperita* L.) e mastruz (*Chenopodium ambrosioides* L.) com ação antiparasitária.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), aproximadamente 80% das pessoas que residem nos países em desenvolvimento estão sujeitos das práticas tradicionais de prevenção e tratamento de diversas doenças que afetam seus animais, já em países menos desenvolvidos, a proximidade desses indivíduos com a natureza e sua adequação aos produtos disponíveis no ambiente promoveu o progresso de sistemas vastos e complexos de conhecimento sobre às práticas etnoveterinárias (MESQUITA, PINTO, MOREIRA, 2017).

Mesmo com diversos relatos que os resultados do tratamento com fitoterápicos são favoráveis, ainda é necessário a realização de mais estudos clínicos, a fim de comprovar a sua eficácia terapêutica, toxicidade, frequência de uso e concentração adequada. Uma vez que muitos fitoterápicos de uso em animais de companhia ainda não apresentam informações sobre suas diversas atividades orgânicas (SOUZA et al., 2020).

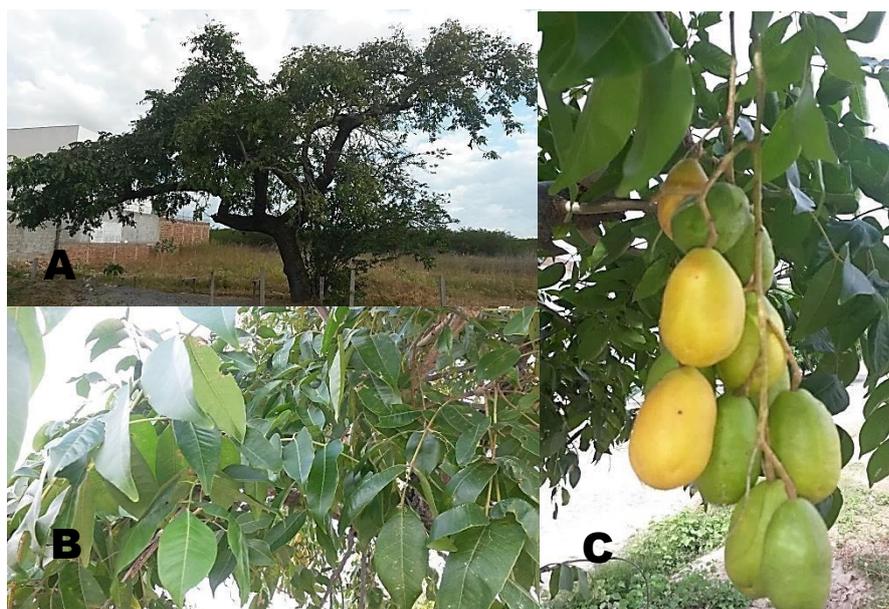
### 2.3. *Spondias mombin* L.

O gênero *Spondias*, da família botânica Anacardiaceae, reúne cerca de 18 espécies distribuídas nos neotrópicos, Ásia e Oceania, com espécies nativas do Brasil. Das espécies que compõe este gênero seis se desenvolvem no Nordeste, desde espécies frutíferas tropicais de grande importância econômica até algumas de importância medicinal. As principais espécies do Nordeste brasileiro são: *S. mombin* L. (cajazeira), *S. purpúrea* L. (siriguelira), *S. cytherea* Sonn. (cajaraneira), *S. tuberosa* Arr. Câm. (umbuzeiro) e *Spondias* spp. (umbu-cajá e umbuguela) (SANTOS et al., 2018).

A SM (Figura 1) pode ser encontrada na região tropical da América, na Ásia, no oeste da Índia ou África, no Brasil, predomina nas regiões Norte e Nordeste, principalmente regiões de Mata Atlântica, Amazônia e Caatinga, no Nordeste do Brasil é popularmente conhecida por cajá, no Sudeste por cajazeira miúda ou cajá pequeno, no Sul por cajazeira ou cajá mirim e no Amazonas por taperebá, pertencente ao reino Plantae, sub-reino Viridiplantae, classe ordem Sapindales, família Anacardiaceae e gênero *Spondias*, a espécie SM é uma árvore frutífera frondosa e perene, alta e que pode chegar a 30m de altura, suas folhas são caducas e possui tronco de 60-75cm de largura, revestido com casca grossa e rugosa. A árvore possui

folhas de 9-11cm de tamanho, 5 à 11 folíolos, flores pequenas, brancas e aparecem em cachos na extremidade dos ramos, já o fruto, uma drupa, amarelado com 2 - 4cm de comprimento e 1,5-2cm de largura, mesocarpo carnoso de sabor agridoce, seu endocarpo é branco, enrugado de 2 a 5 lóculos (ALVES, 2017).

**Figura 1** – Cajazeira (*Spondias mombin* L.): A) Árvore, B) Folhas e C) Frutos.



Fonte: Arquivo pessoal.

Segundo Tropicos (2013), a planta pode apresentar agentes bioativos, tradicionalmente utilizados por cunho popular e que fazem parte de um acervo de conhecimento passado de geração a geração em diferentes regiões do planeta (Tabela 1).

**Tabela 1** – Uso popular das partes da planta *Spondias mombin* L. de acordo com regiões.

PARTE DA PLANTA	REGIÃO/LOCAL	USO/TRATAMENTO
Casca	Nigéria	Antifúngico e inseticida,
	Senegal	Anti-hemorrágico
	Cuba	Anticancerígena
	Índias Ocidentais, Guiana e África Oriental	Curtimento
	Guiné-Bissau	Curativo de feridas
	Costa do Marfim	Antihelmíntico
Folha	Guiné-Bissau	Loção oftálmica
	Nigéria	Antitumoral
	Costa do Marfim	Antihelmíntico, tratamento da doença de Pott
	Senegal	Cicatrizante, hemostático
	Congo	Analgésica
Semente	Filipinas	Toxicênica

Raiz	Senegal	Cólica
	Guiné-Bissau	Antioxidante
	Costa do Marfim	Febrífugo
Fruto	África Ocidental	Diurético
	Senegal	Bebida Fermentada

Fonte: TROPICOS, 2013.

### 2.3.1. Característica fitoquímica

Da Silva (2015) afirmaram que as folhas da *S. mombin* L. apresentam atividade antibacteriana atribuída à presença de taninos, saponinas e antraquinonas, tal atividade ocorre pelo ácido anacárdico que possui a capacidade de inibir a  $\beta$ -lactamase. Segundo os autores a planta não apresenta atividade antifúngica significativa, e sua atividade antiviral é atribuída aos dois elagiotaninos com esta propriedade isolados (geranina, o principal componente, e galiolgeranina, um dideshidroelagiotanino), em suas pesquisas outros compostos secundários foram identificados, como ácido 2-O-cafeicol-(+)-alohidroxicítrico e butil éster de ácido clorogênico, bem como o ácido elágico e quercetina. Em relação a atividade antiparasitárias apresentam resultados promissores. Há também evidência de atividade leishmanicida, devido à presença de galiotaninos em sua composição química, e devido a presença de saponinas, alcaloides, flavonoides, taninos e a quantificação dos minerais (cálcio, potássio, selênio, vitaminas A e C, ferro e cromo) desempenha atividade anti-helmíntica.

Os compostos tânicos presentes na planta realizam atividades bactericidas através da ligação com íons metálicos; promovem atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres; tem habilidade de ligar com outras moléculas (proteínas e polissacarídeos), em feridas, queimaduras e inflamações, auxiliam formando um biofilme protetor (tanino-proteína e/ou polissacarídeo) sobre o epitélio lesionado, permitindo o processo de cicatrização tecidual ocorra naturalmente (SOUZA, DINIZ, 2018).

As saponinas da planta em solução aquosa promovem espuma, isto ocorre, pois, possui em sua estrutura uma parte lipofílica (aglicona ou sapogenina) e uma parte hidrofílica constituída por um ou mais açúcares, tal formação é estável à atividade de ácidos minerais diluídos o que diferencia dos sabões comuns, elas desorganizam a membrana celular promovendo a “lise”. Outra característica encontrada é a capacidade de agregar com esteroides promovendo ação antifúngica e hipocolesterolmiante (FERNANDES et al., 2019).

Seus alcaloides podem ser definidos como compostos bioativos que contém em sua estrutura molecular um nitrogênio e derivados de aminoácidos, tornando a planta tóxica aos microrganismos e repelente para insetos (BAUMANN et al., 2019).

### 2.3.2. Aplicações de *Spondias mombin* L. *in vitro* e *in vivo*

Os compostos presentes em SM apresentam algumas funções de interesse científico, como descrito por Metibemu et al. (2020) que realizaram estudo demonstrando que carotenoides (astaxantina,  $\beta$ -caroteno-15,150-epóxide, e 7,70,8,800-tetrahidro- $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno) isolados das folhas da planta são pro-apoptóticos, apresentando credibilidade às habilidades destes carotenoides.  $\beta$ -caroteno-15,150-epóxida e 7,70,8,8-tetrahidro- $\beta$ ,  $\beta$ -caroteno (antagonistas XIAP) são candidatos a medicamentos que podem resistir e propensos a células cancerígenas à morte de células apoptóticas. Além de Siqueira (2015) que verificou a ação anti-herpética da planta, que foi avaliada e comprovada *in vitro* contra o vírus herpes simples tipo-1 através dos modelos virucidas, pós-infecção, adesão e penetração do extrato, frações e da geranina, além da identificação do mecanismo de ação envolvido na ação anti-herpética do extrato e geranina através dos ensaios *in vitro*.

Além dessas aplicações, a SM tem sido alvo de várias pesquisas quanto a sua capacidade antibacteriana, conforme verificado a seguir.

A SM tem uma ação para inibição bacteriana, principalmente gram positivas como descrito por Leonez et al. (2018) quando observaram a inibição de cepas de *Staphylococcus coagulase negativa*. Já Santos et al. (2020) observaram a ação bacteriana de extratos da folha da planta sobre o crescimento planctônico de *S. aureus* e *E. faecalis*, estimulando a pesquisa para tratamento de infecções endodônticas persistentes através de produtos bioativos, esses efeitos podem ser graças a ação de flavonoides.

O efeito bioativo antimicrobiano dos flavonoides em bactérias deve-se à atribuição de seus grupos fenólicos hidroxila terem ligação com as proteínas, atuando como inibidores de enzimas bacterianas, interferindo em suas vias de síntese, inibindo a quebra do DNA em baixas concentrações, como também na formação do biofilme (SANTOS, RODRIGUES, 2017).

Oguegbulu, Abo e Afieroho (2020) verificaram que o extrato de SM apresentou a concentração inibitória mínima (MIC) de 10mg/ml e 5 mg/ml para *Streptococcus faecalis* e *Staphylococcus aureus*, respectivamente, mas não apresentou ação para *Escherichia coli* e *Klebsiella pneumoniae*. Lima et al. (2021) observaram que extratos de SM em diferentes concentrações apresentaram atividade antimicrobiana superior ao digluconato de clorexidina 0,12% contra os microrganismos com essa atividade associada à caracterização química desses

extratos e durante a cinética bacteriana, os resultados foram melhores nas 04 horas iniciais quando observados por 24 horas.

Nanopartículas de prata associadas ao extrato aquoso de SM potencializaram a eficácia antibacteriana contra isolados clínicos das bactérias. As AgNPs sintetizadas verdes também podem ser usadas para produzir novos agentes antibacterianos (ASOMIE et al., 2021).

Fernandes (2019) estudando SM em tetos de bovinos, observou a eficácia do extrato da planta como potencial agente antibacteriano, alegando que o decocto das folhas apresentou um bom potencial antisséptico alternativo comparado aos produtos convencionais utilizados no pós-dipping, identificando princípios ativos através da análise fitoquímica como fenóis, taninos, flavonóis, flavonas, flavonóis, xantonas, esteroides, triterpenóides, saponinas e quinonas. A avaliação de sinais patológicos, que indicam a presença de mastite nos animais submetidos ao experimento, mostrou que não houve alterações clínicas nos animais submetidos ao tratamento com iodo e decocto da planta, já a água e o ácido láctico não inibiram a presença da mastite clínica, sendo observada sintomatologia como hiperemia, edema, secreção, calor e dor nos tetos dos animais.

No trabalho de Freitas et al. (2020) avaliaram *in vitro* os parâmetros químicos e de citotoxicidade seletiva do extrato hidroalcoólico da casca (ECC) e fruto (ECF) da SM, verificando também a atividade antimicrobiana dos mesmos sobre *Candida* spp., *Prevotella intermedia*, *Fusobacterium nucleatum* e *Porphyromonas gingivalis*. L. Os extratos não demonstraram atividade antifúngica, mas o ECC apresentou ação bactericida na concentração de 8mg/mL, concluindo que os extratos da casca do cajá poderiam ser considerados alternativa viável como antibiótico devido a menor toxicidade comparada aos fármacos disponíveis comercialmente.

Dantas et al. (2020) observaram que a planta SM, utilizada como antisséptico em feridas cirúrgicas de felinos domésticos submetidos a ovariohisterectomia e orquiectomia, inibiu bactérias gram positivas e negativas. Já o uso da mesma planta como antisséptico em caprinos foi verificado por Medeiros et al. (2020), observando halos inibitórios superiores a 20mm em análise *in vitro* e uma supressão no número de bactérias da glândula mamária de matrizes caprinas.

#### 2.4. OTITE CANINA

A otite trata-se de um processo inflamatório e infeccioso do conduto auditivo que acomete os animais, correspondendo à 20% das enfermidades otológicas em cães atendidos na clínica médica veterinária (SANTOS et al., 2019). O sexo, idade e peso dos animais não são

fatores para a ocorrência desta doença, embora caso o canal auditivo dos animais possua excesso de pelos, produção excessiva de cerúmen, o animal esteja em local de alta umidade ou sejam idosos com doenças endócrinas ou distúrbios imunomediados, isto sim determina a predisposição a tal processo inflamatório e infeccioso otológico (ZUR et al., 2011).

Sua etiologia é multifatorial e atinge a todos os animais de companhia, embora tenha início quando a barreira de proteção epitelial do conduto auditivo é danificada por fatores primários (que iniciam o processo inflamatório), podendo ser elementos alérgenos e ectoparasitos; secundários, como microrganismos bacterianos e fúngicos; além dos predisponentes (aqueles que promovem o surgimento da doença), a exemplo das alterações anatômicas da orelha dos animais ou o excesso de pêlos; como também perpetuantes (os que dificultam o tratamento e agravam o quadro clínico do animal), como as alterações patológicas (hiperplasia e estenose) e ainda os próprios fatores secundários (PATERSON, 2016).

As otites podem ser classificadas como otite externa, otite média ou otite interna (LUCAS et al., 2016). De acordo com as classificações da enfermidade, a otite externa (Figura 2) é considerada uma das problemáticas otológicas mais comuns em cães, principalmente pelas características anatômicas da orelha canina que torna um desafio diagnóstico e terapêutico para o clínico veterinário. Neste caso, os principais sinais clínicos identificados são dor a palpação, inflamação e aumento de exsudado ceruminolítico com odor característico, como também podem estar associados o prurido, a descamação e presença de crostas (BLAKE et al., 2017).

**Figura 2** – Cão com otite externa bacteriana em conduto auditivo: A) Ausência de secreção; B) Secreção seruminolítica; C) Secreção mucopurulenta.



Fonte: Arquivo pessoal.

A dor do animal é resultado da estimulação de neurónios nociceptores, que através da estimulação sensorial dolorosa destes promovem a sensação atribuída pelo sistema nervoso central (SNC) (KLAUMANN, WOUK, SILLAS, 2008). O processo inflamatório nesta enfermidade surge através de eventos em cascata bioquímicos e celulares, compactuando o

extravasamento de fluídos com ativação enzimática (catalase), migração celular (macrófagos e leucócitos polimorfonucleares), liberação de mediadores (interleucina-1 (IL-1), interleucina-6 (IL-6), fator- $\alpha$  de necrose tumoral (TNF- $\alpha$ ), bradicinina, serotonina, ácido araquidônico, adenosina, histamina, neuropeptídios e fator de crescimento do nervo (NGF)), sensibilização e ativação de receptores (selectinas e integrinas), a lise tecidual e os mecanismos de reparo (colagenase, estromelina) (CARVALHO, LEMÔNICA, 2020).

O processo inflamatório estimula o aumento da produção de cerúmen pelas glândulas otológicas, elevando a umidade e pH auricular, que favorece a multiplicação de bactérias e fungos causadores de infecções secundárias (BAJWA, 2019).

Quando a otite externa se prolonga sem tratamento os sinais clínicos evoluem e levam a alterações significativas como hiperplasia epitelial, hiperqueratose, hiperplasia das glândulas sebáceas e ceruminosas, prurido, otalgia e inclinação da cabeça, caracterizando o desenvolvimento da otite média que tende a agravar-se ainda mais com uma estenose total do canal auditivo externo, podendo ou não estar presente os sinais neurológicos (RADLINSKY, MASON, 2011).

Estas alterações podem ser reversíveis se a causa base for eliminada, mas em caso de cronicidade da otite média, o animal pode desenvolver fibrose e calcificação da cartilagem timpânica, sendo esta última uma alteração patológica irreversível fisiologicamente, necessitando então a abordagem cirúrgica (SILVA et al., 2016).

A presença de corpos estranhos, neoplasias, pólipos, traumas, e até mesmo a cronicidade da otite média, levam ao desenvolvimento da otite interna, afetando as estruturas anatômicas auriculares (cóclea, vestíbulo e canais semicirculares) que promovem quadros clínicos associados à surdez e sinais neurológicos (COLE, 2015).

O diagnóstico desta enfermidade é realizado através de uma série de procedimentos, inicialmente é feita uma boa contenção do animal, para os casos em que os canais auditivos estiverem sensíveis ou doloridos é necessário o uso de anestesia (GOTH, 2011), após isto podem ser feitas as inspeção direta auriculares através da otoscopia, importante exame que observa a quantidade e natureza do exsudato, as alterações proliferativas microbianas e a aparência da membrana timpânica; ou a fibrotoscopia, que fornece uma visualização mais ampla de todo o conduto auditivo (vertical e horizontal) através de uma câmera de fibra ótica, atuando na remoção de elementos sólidos que favorecerem o desenvolvimento microbiano como também a realização de lavagem para minimizar a carga microbiana auricular (LUCAS, 2016).

O diagnóstico é atribuído também pelo exame citológico, extremamente útil na determinação do agente microbiano etiológico envolvido no processo infeccioso, e a cultura microbiana associada ao antibiograma, para escolha do antimicrobiano apropriado no tratamento (PATERSON, 2016). No início da enfermidade a citologia pode ser suficiente para a identificação dos microrganismos, dando início a um tratamento empírico, embora seja necessária a cultura bacteriana associada aos testes de sensibilidade *in vitro* aos antimicrobianos, principalmente tratando-se de quadros crônicos ou recidivantes da doença, porque estes métodos favorecem a um bom prognóstico e previnem a disseminação de bactérias multirresistentes (GHELLER et al., 2017).

O tratamento otológico consiste na higienização local com uso de medicamentos ceruminolíticos, pois o excesso de cerúmen dificulta o contato das medicações tópicas com o epitélio do conduto auditivo e os microrganismos, inviabilizando o tratamento (NEVES et al., 2018). Além do uso tópico e, na maioria das vezes, sistêmico de medicamentos anti-inflamatórios, como glicocorticóides (CHERMPRAPAI et al., 2019), e também antimicrobianos contra bactérias Gram positivas e negativas, como a ciprofloxacina e tobramicina que mostram maior capacidade de inibir o crescimento microbiano nesta patologia (SANTOS et al., 2019), mas deve-se tomar cuidado com o uso inadequado ou não racional destes medicamentos pois podem prejudicar a eficácia do tratamento clínico e favorecer a seletividade de bactérias que se tornam multirresistentes (BOURÉLY et al., 2019).

#### **2.4.1. Agentes etiológicos bacterianos em otites**

As bactérias surgiram na terra por volta de 3,5 bilhões de anos atrás vivendo em um ambiente hostil, com temperaturas elevadas, sofrendo influências de radiações ultravioletas e cósmicas, tempestades diárias e até mesmo com a falta de nutrientes, elas foram capazes de suportar todos os habitats. Esta capacidade de adaptação e transmutação está relacionada a sua estrutura genômica, que garante a troca de genes entre elas através de elementos não cromossômicos (plasmídios, transposons e bacteriófagos) como também fatores externos (meio ambiente) (EMYINUMARU et al., 2018).

Elas foram identificadas pela primeira vez por van Leeuwenhoek por volta dos anos 1670, com o auxílio do microscópio, mas apenas no século XIX foi possível confirmar que eram as causadoras de processos infecciosos, iniciando então uma série de pesquisas a respeito (SOUSA et al., 2020).

No reino animalia todas as espécies possuem uma microbiota bacteriana própria, os cães (*Canis lupus familiaris*), podem desenvolver processos infecciosos dermatológicos causados

por bactérias, que devido a relação próxima entre os animais e seus tutores, são microrganismos capazes de promover enfermidades também no ser humano, tornando assim uma problemática tanto da medicina humana quanto veterinária (GHELLER et al., 2017; SCHERER et al., 2018).

A variabilidade da microbiota da pele de cães está mais intimamente relacionada ao ambiente do que à raça do animal, o tipo de pelagem ou o local epitelial, estas variedades microbianas contribuem para a imunidade da pele do animal aumentando as respostas imunes contra microrganismos patogênicos ou inibindo diretamente o crescimento destes (CUSCÓ et al., 2017).

O conduto auditivo externo dos cães compartilha as mesmas características fisiopatológicas epiteliais do resto do corpo, deste modo os microrganismos normalmente encontrados nas diversas partes de seu corpo também podem estar presentes nas orelhas (LUCAS et al., 2016), embora os gêneros bacterianos otológicos mais relatados em literatura sejam *Staphylococcus* spp, *Streptococcus* spp, *Proteus* spp e *Escherichia coli* (ALMEIDA et al. 2016).

Para desenvolver um processo infeccioso otológico, os microrganismos precisam aderir e invadir o epitélio, desviar do sistema imunológico do hospedeiro e colonizar os tecidos, promovendo só então a doença em função das lesões causadas, comprometendo secundariamente todas as funções fisiológicas locais, caso o animal não possua adequados meios de defesa e proteção contra os patógenos, que nele buscam obter nutrientes e condições fisiológicas adequadas, manifesta uma determinada doença (sinais e sintomas) por períodos (incubação, período prodrômico, transmissão e recuperação) que são definidos pela patogenicidade de cada microrganismo e sua relação com o hospedeiro (MELIÇO-SILVESTRE, CUNHA, 2008).

Este processo infeccioso otológico foi identificado proveniente dos mais diversos microrganismos bacterianos, sendo eles *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Stomatococcus* spp., *Proteus* spp., *Citrobacter freundii*, *Pantoea agglomerans*, *Enterococcus* spp. e *Enterobacter* spp.

#### 2.4.1.1. *Staphylococcus* spp.

São bactéria de morfologia cocos gram-positivos com tamanho entre 0,5 e 1,5 µm de diâmetro, apresentam arranjos de forma isolada, aos pares ou em cadeias curtas, mas sempre predominando agrupamentos que formem cachos devido à sua divisão celular em três direções perpendiculares. Pertencem à família *Staphylococcaceae* e estão distribuídos na natureza, habitando superfícies inanimadas, produtos hospitalares, além da pele e mucosa dos seres

humanos e animais, tendo a espécie *S. pseudointermedius* como principal microrganismo patogênico nas otites em cães (ELMER et al., 2012; SCHERER et al., 2018).

Este gênero microbiano é composto por 52 espécies e 29 subespécies (ALMEIDA et al., 2016), classificadas em dois grupos, que determina sua patogenicidade, segundo a capacidade de produção da enzima coagulase. Esta enzima produzida tem a capacidade de converter o fibrinogênio do plasma sanguíneo em fibrina, na presença ou não do íon  $\text{Ca}^{2+}$  e dos fatores V, VI e VII da cascata de coagulação. Estes microrganismos com estratégia de patogenicidade, depositam em sua superfície esta fibrina dificultando serem fagocitadas pelas células de defesa (KARAHAN, CETINKAYA, 2007).

Possuem fatores de virulência (proteases, lipases, desoxirribonucleases, toxinas, mediadores fisiológicos, agentes líticos, biofilmes, fatores de aderência e fatores antifagocíticos) que influenciam suas interações com células e superfícies. Estas bactérias aderem às membranas celulares causando colonização, invasão tecidual e endocitose, além de inibirem o sistema imunológico do animal, escapando dos mecanismos de defesa e proliferando em ambientes hostis, a principal forma de identificação deste gênero é através da prova que identifica a presença da enzima catalase, sua característica é diferenciar *Staphylococcus* spp. de *Streptococcus* spp. (ZACHARY, MCGAVIN, 2013).

#### 2.4.1.2. *Streptococcus* spp.

Este gênero bacteriano inclui organismos Gram-positivos em forma de cocos e organizados em cadeias, anaeróbios facultativos, não produtores de catalase ou de citocromo-oxidase. São microrganismos comensais da pele de humanos e animais sendo patógenos ou oportunistas, com mais de 60 espécies já identificadas, tem sua classificação proposta por Rebecca Lancefield na década de 1930 baseada na reação antigênica dos carboidratos associados à parede celular destes microrganismos, com base nesta abordagem, foram distribuídos em grupos que variam de A a W, dependendo dos anticorpos que reconhecem os carboidratos específicos de cada uma espécie (HAENNI, LOPO, MADEC, 2018). Dos *Streptococcus* spp., de acordo com Haenni, Lopo, Madec (2018), os mais relevantes responsáveis por doenças em animais são: *S. pyogenes* e *S. Canis* (caninos e felinos), *S. pneumoniae* (equinos), *S. Agalactiae* e *S. Uberis* (bovinos), *S. gallolyticus* spp. *Gallolyticus* (aves), *S. Porcinus* e *S. Suis* (suínos), *S. Iniae* (peixes).

Estas espécies citadas são homofermentadores, sendo o ácido lático o produto final da fermentação da glicose. Podem produzir hemolisinas, que causa reação hemolítica em meio sólido contendo 5% de sangue de carneiro, classificando-os como alfa-hemolíticos (causam

hemólise parcial no meio de cultura, como também uma zona cinza-esverdeada ao redor da colônia), beta-hemolíticos (causam lise completa das hemácias que rodeiam a colônia, formando uma zona transparente nesta região) ou gama hemolíticos (não causam hemólise) (ANVISA, 2008).

Sua patogenicidade é ampla, uma das maneiras é através da capacidade de induzir células T que têm como alvos antígenos específicos da pele por meio de mimetismo molecular, desta forma estimulam processos inflamatórios crônicos. As células T ativadas por antígenos também podem ser primariamente autorreativas, liberando citocinas pró-inflamatórias e citotóxicas para células da pele que expressam autoantígenos sem semelhança ou mimetismo molecular com antígenos bacterianos e específicos da pele. Pode ocorrer também a ligação dos antígenos estreptocócicos, presentes na camada dérmica, aos antígenos leucocitários expressando exageradamente moléculas de isotipo DR (HLA-DR) em macrófagos, células dendríticas e queratinócitos que aumentam a inflamação (LEWIS et al., 2019).

Outros mecanismos de patogenicidade deste gênero microbiano é que possuem a capacidade de tolerância aos ácidos, mantendo a via glicolítica mesmo em ambientes com valores de pH inibidores do crescimento (abaixo de pH 4,4), isso está relacionado com a síntese de glucanos insolúveis e formação de biofilme, mediado pela bomba F1F0-ATP e também por adaptações na expressão de genes e proteínas, uma vez que, dentro do biofilme, conseguem suportar as alterações do pH. Agregam também proteínas conectivas à fibronectina; anti-proteólise; antifagocitose (ácido hialurônico, a proteína M e o SIC (inibidor da lise mediada pelo complemento)); C5a peptidase; exoenzimas (DNase, hialuronidase, IDES (enzima que degrada IgG) e SPEB (exotoxina pirogênica)); e ativador do plasminogênio (estreptoquinase), todos responsáveis pela capacidade de agravar quadros clínicos infecciosos. (MCMILLAN et al., 2006; MARIPUU et al., 2008).

#### 2.4.1.3. *Enterococcus* spp.

Estes microrganismos são bactérias gram-positivas, facultativas, não formadoras de esporos, anaeróbicas e podem sobreviver a uma ampla gama de temperaturas, pH, Hiper osmolaridade e dissecação prolongada, os patógenos mais encontrados em cães pertencentes a este gênero são *E. faecalis* e *E. faecium* (ALI et al., 2014). São patógenos oportunistas que fazem parte da flora microbiana normal no trato gastrointestinal de animais, embora já tenham sido relatados oriundos de solo, água, plantas, insetos e até alimentos, nos casos encontrados em otite canina a principal indicação é de contaminação fecal (HAMMERUM, 2012).

Por apresentarem algumas semelhanças morfológicas e bioquímicas, os *Enterococcus* spp. foram considerados parte do gênero *Streptococcus* spp., sendo classificados como estreptococos do grupo D até meados da década de 1980. Mas então, quatro grupos separados de estreptococos foram identificados, definidos como os estreptococos piogênicos, viridans, lácticos e os enterococos (GARCÍA-SOLACHE, RICE, 2019). Somente em 1984 caracterizou-se como gênero *Enterococcus*, possuindo 58 espécies descritos pela literatura (LPSN, 2010).

Estes microrganismos são extremamente patogênicos, tendo a capacidade de invadir as células do sistema imunológico; se ligar a células hospedeiras epiteliais, a matriz extracelular (EM) e materiais inertes, como também à equipamentos médicos; capacidade de formar biofilmes lhes dando multirresistência aos antimicrobianos e ao ataque fagocítico. Fatores de virulência são mais descritos em *E. faecalis*, tornando-o a espécie com liderança dentre as infecções enterocócicas (GARCÍA-SOLACHE, RICE, 2019).

Mesmo com toda esta capacidade de patogenicidade, este gênero vem ganhando destaque por seu estudo a respeito da produção de suas bacteriocinas capazes de impedir o crescimento de várias outras bactérias (*L. monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Vibrio cholerae*) (JAVED et al., 2011).

#### 2.4.1.4. *Stomatococcus* spp.

Os microrganismos pertencentes a este gênero possuem morfologia em cocos, de 0,9 – 1,5 µm de diâmetro, apresentam-se em pares ou tétrades, com colonias aderentes, mucoides e cinzas, de coloração gram-positiva, com os resultados das provas bioquímicas, sendo: catálase variável, motilidade negativa, crescimento em NaCl a 5% negativo, oxidase negativa, sensível a vancomicina, bile esculina positiva, PYR positivo e não são aeróbios estritos (ANVISA, 2008).

Embora compartilhem muitas características morfológicas semelhanças com espécies de *Staphylococcus*, *Micrococcus* e *Streptococcus*, os resultados das provas bioquímicas citados acima, associados a resistência em antibiograma à clindamicina, aminoglicosídeos, sulfametoxazol/trimetoprima e ciprofloxacina, minimizam um provável erro na identificação deste gênero microbiano (SPIEGELHAUER et al., 2019).

São classificados como comensais da cavidade oral e trato respiratório superior em humanos. Este gênero é um patógeno oportunista pouco frequente, afeta principalmente pacientes imunossuprimidos (RAMANAN et al., 2014). Turhanoglu et al. (2016) relataram a ocorrência de *Stomatococcus* spp. em indivíduos com fatores de riscos primários, como pneumonia. Sua patogenicidade é a característica de inibição do inibidor da COX-2,

aumentando a produção de prostaglandina E, que provoca alterações respiratórias sistêmicas nos animais.

Esse agente também já foi relatado em animais por Oliveira (2020), que destacou a ocorrência de *Stomatococcus* spp. em felinos com otite. A origem deste gênero de bactéria provavelmente é ambiental, conforme relataram *Stomatococcus* spp. em amostras provenientes do ar.

#### 2.4.1.5. *Proteus* spp.

*Proteus* spp. são microrganismos bacterianos gram-negativos em forma de bastonete, bem conhecidos pela produção de urease e capacidade de habitar uma ampla variedade de ambientes, incluindo solo, fontes de água e esgoto, mas é predominantemente um comensal do trato gastrointestinal de humanos e animais, este gênero está entre as enterobactérias mais comuns isoladas de infecções caninas do canal auditivo, sendo o elevado número de observações desses microrganismos entendido como uma complicação na inflamação (BUGDEN, 2007).

Suas colônias bacterianas crescem em ágar MacConkey com tonalidade branca, e na realização dos testes para sua identificação apresentam H<sub>2</sub>S, fenilalanina, urease positivos (ANVISA, 2008).

Estes possuem os mais diversos fatores de patogenicidade (aderem ao tecido epitelial com facilidade graças a grande quantidade de flagelos e fímbrias (fímbria resistente à manose do tipo *Proteus* - MR/P) as tornando também resistentes a antimicrobianos; produzem urease que aumenta o pH ao redor dos microrganismos dificultando o crescimento das outras bactérias; produzem toxinas e protéases contra células (incluindo os tipos I, III, IV, V e VI.); produzem desaminases de aminoácidos para cetoácidos atuarem como sideróforos; penetram e internalizam células hospedeiras e até outras bactérias; produzem hemolisinas (HpmA e HlyA), como também formam biofilme; além de algumas espécies carregarem um elemento integrativo e conjugativo (ICE *Pm1*) que proporciona a autorreplicação e autotransferência para outras cepas e espécies, transferindo genes de virulência e resistência a antibiótico) que atuam em conjunto, dificultando o sucesso na terapêutica clínica (MICHELIM, 2014; ARMBRUSTER et al., 2018).

#### 2.4.1.6. *Citrobacter freundii*

*Citrobacter freundii* são microrganismos em forma de bacilos facultativos, anaeróbicos e gram-negativos, pertencentes a Enterobacteriaceae, estes microrganismos são encontrados na água, solo, alimentos e colonizam intestinos de animais e humanos. Antigamente eram apenas reconhecidos como contaminantes ambientais ou patógenos de baixa virulência, mas agora são vistos por causar graves infecções em sistema urinário, gastrointestinal, respiratório, cardiovascular, comprometendo também o fígado (em trajeto biliar), peritônio, ossos, meninges e tecidos moles, além de agravar feridas (KUMAR et al., 2013) em otite canina (GARCIA, FREITAS, 2019).

Suas colônias bacterianas crescem em ágar MacConkey com tonalidade rosa, e na realização dos testes para sua identificação apresentam H<sub>2</sub>S, indol, citrato, motilidade, lactose, gás de glicose, sacarose e arabinose positivos, além de fenilalanina, lisina e ornitina negativos, como também urease variável (ANVISA, 2008).

A infecção por *Citrobacter freundii* pode ocorrer em casos esporádicos ou como propagação nosocomial (GAIBANI et al., 2013), dessa forma os médicos veterinários devem manter a necessidade de identificação deste tipo microbiano com o auxílio do antibiograma para uma melhor resolução dos problemas do animal com otite. Provavelmente *Citrobacter freundii* tornou-se um patógeno para humanos e animais por causa da presença de vários mecanismos patogênicos que também são utilizados por *Escherichia coli* enteropatogênica (EPEC) e *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), como a produção de adesinas que auxiliam na intensa adesão as células epiteliais (LOPES, 2016) agravando o quadro infeccioso.

#### 2.4.1.7. *Pantoea agglomerans*

*Pantoea agglomerans* pertence a família Enterobacteriaceae, é um bacilo gram-negativo, fermentador de glicose, H<sub>2</sub>S negativo, fenilalanina negativo, ornitina negativa, lisina negativa e urease positiva. Suas colônias crescem bem em agar MacConkey e apresenta características bioquímicas de resistência à fosfomicina e utilização de d-tartarato, podendo lhe diferenciar de outras espécies do gênero *Pantoea* (PUSEY et al., 2008).

O gênero inclui várias espécies que geralmente estão associadas com plantas, seja como epífitas ou como patógenos, algumas espécies podem causar doenças em humanos. *Pantoea agglomerans* é a espécie mais comumente isolada dos seres humanos, é amplamente distribuída na natureza incluindo as plantas, água, solo, humanos e animais (GRIMONT, GRIMONT, 2005), e ainda Filipo et al. (2018) relataram a ocorrência de *Pantoea agglomerans* causando infecção otológica em cães.

Apresenta como fatores de virulência a associação de adesão tecidual (sfa, papA, e papC) e sideroforos (fyuA e iutA), como também a capacidade de produção de diferentes compostos como herbicolinas, pantocinas, fenazinas, e outros compostos desconhecidos, responsáveis pela diminuição da concorrência microbiana local favorecendo a proliferação desta espécie (PUSEY et al., 2008).

#### 2.4.1.8. *Enterobacter* spp.

Os microrganismos do gênero *Enterobacter* spp. podem ser encontrados na natureza (ambientes como água e esgoto, no solo e em vegetais), e comensais no trato intestinal de humanos e animais. Possuem forma bacilar de 0,6 – 3,0 µm de diâmetro, móveis de coloração gram-negativa, sua colônia não tem característica mucóide, facultativamente anaeróbicos e com crescimento a temperaturas entre 30 – 37 C (GRIMONT, GRIMONT, 2006).

As espécies de *enterobacter* são membros do grupo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* e espécies de *Enterobacter*), sendo os principais responsáveis pela causa de infecções nosocomiais resistentes (DAVIN-REGLI et al., 2019).

Como patogenicidade, os representantes desse gênero abordam diversos mecanismos, sendo a produção de descarboxilases de histamina como fator de toxicidade; propriedades adesivas estabelecendo ou mantendo infecções persistentes; produção de hemaglutininas responsáveis pela aglutinação de eritrócitos; e nos ambientes com condições limitantes de ferro tornam-se sideróforos, produzindo compostos quelantes de ferro como fenolatos (enterocelina) e Hidroxamatos (aerobactina) para solubilizar e importar o ferro necessário (GRIMONT, GRIMONT, 2015).

Antes do uso exagerado de antimicrobianos, as espécies *Enterobacter* spp. raramente eram tidas como patogênicas, mas esses microrganismos foram cada vez mais encontrados, causando infecções, no trato urinário e sistema vascular (bacteremia), para sua identificação se fez necessário testes laboratoriais com utilização de fonte de carbono, glicose e oxidação (na presença ou ausência de quinona pirroloquinolina), gluconato e testes de 2-cetogluconato desidrogenase, testes de tetrionato redutase e β-xilosidase, gerando como resultados positivos para os testes de citrato de Voges-Proskauer e Simmons, produção ácida a partir de D-glicose, D-manitol, salicina, L-arabinose, L-ramnose, D-xilose, trealose, D-celobiose e maltose, hidrolisam o-nitrofenil-β-D-galactosídeo, reduzem nitrato e oxidam D-glicose a D-gluconato na presença de pirroloquinolina quinona. Um fator interessante é que todas as espécies de

*enterobacter* (exceto *E. agglomerans*) produzem gás a partir da glicose (DAVIN-REGLI et al., 2019).

## 2.5. ANTIMICROBIANOS

Antimicrobianos são substâncias de origem natural, química ou sintética com capacidade de destruir ou impedir a multiplicação de bactérias. De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, a antimicrobioterapia tem por finalidade curar uma doença infecciosa ou combater um agente infeccioso, embora seu uso indiscriminado acarreta inúmeras consequências, entre as quais está a resistência bacteriana. O uso adequado de antimicrobianos é um dos objetivos estabelecidos pela OMS para o século XXI. Desde o uso dos primeiros antimicrobianos até os dias atuais, notou-se um aumento no índice de microrganismos multirresistentes, causado pela pressão seletiva do uso inadequado e indiscriminado desses fármacos, tornando assim este fator uma ameaça à saúde pública, principalmente devido a incapacidade da indústria farmacêutica em disponibilizar respostas terapêuticas para tais agentes bacterianos (SILVA, FERREIRA, 2020).

Entretanto, foi notório mundialmente que o desenvolvimento de antimicrobianos eficientes contra às infecções promoveu aumento significativo no tratamento clínico das doenças infecciosas, reduzindo as taxas de morbidade e mortalidade, permitindo progressos na medicina veterinária (COSTA et al., 2012).

Um antimicrobiano ideal deve possuir atividade em alvo seletivo, ação bactericida rápida, espectro de ação que não interfira no desenvolvimento da microbiota saprófita, baixo nível tóxico em altos níveis terapêuticos, ínfimas reações adversas, amplas vias de administração, boa distribuição e também que não atrapalhe as defesas imunológicas do animal, não induza resistência microbiana e possua boa relação custo/benefício, embora todas essas características sejam difíceis de obter por um único medicamento (COSTA, JUNIOR, 2017).

De acordo com Guimarães et al. (2010), os antimicrobianos podem se classificar segundo sua origem: naturais (provenientes a partir de organismos vivos), semissintéticos (provenientes de origem natural submetidos a métodos de síntese em laboratório) ou sintéticos (produzidos apenas em laboratório); de acordo com suas ações sobre os microrganismos: bacteriostáticos (inibem o crescimento microbiano, mas necessitam da atuação do sistema imunológico na presença de organismos infecciosos) ou bactericidas (causam a morte dos microrganismos em cerca de 99,99%); ou segundo sua farmacocinética (trajeto realizado pelo medicamento - absorção, distribuição, metabolização e excreção) e

farmacodinâmica (a resposta fisiológica promovida pelo medicamento no organismo) (PAULINO et al., 2021).

O mecanismo de ação dos antimicrobianos atuam da seguinte forma:

1) Inibição da síntese proteica: As bactérias possuem ribossomos (subunidades 30s e 50s) responsáveis pela síntese das proteínas, os aminoglicosídeos, tetraciclina, cloranfenicol, macrólitos e lincosamida utilizam este mecanismo inibindo ou modificando a produção destas proteínas, se ligando a uma das duas subunidades impedindo o metabolismo e crescimento microbiano (COSTA, JUNIOR, 2017).

2) Inibição da síntese de ácidos nucleicos: neste caso as quinolonas (ciprofloxacina, norfloxacina, ofloxacina e a rifampicina) atuam inibindo as enzimas girase e topoisomerase IV que são responsáveis pelo processo de replicação do DNA, como também a RNA polimerase responsável pelo processo de transcrição, impedindo desta forma a síntese de mRNA, e consequentemente impedem a de proteínas (DZIDIC et al., 2008).

3) Inibição da síntese de parede celular: Quando atuam impedindo a síntese dos peptidoglicanos, este mecanismo é atribuído aos antimicrobianos do grupo  $\beta$ -lactâmico (penicilina e as cefalosporinas) que realizam esta ação inibindo as enzimas de formação do peptidoglicano através do bloqueio do pirofosfato-bactoprenol à fosfobactoprenol em gram-positivos, ou a vancomicina que impede as ligações cruzadas entre os ácidos N-acetilglucosamina e o N-acetilmurâmico, responsáveis pela formação do peptidoglicano da parede bacteriana (BAPTISTA, 2013).

4) Desorganização da membrana celular: Com este mecanismo atuam as polimixinas, moléculas anfipáticas tensoativas que se ligam com as moléculas de polissacarídeos na membrana externa bacteriana, sequestrando o cálcio e o magnésio fundamentais para a estabilidade da membrana, causando então uma desordem, alterando a permeabilidade e provocando o vazamento do conteúdo intracelular (DZIDIC et al., 2008).

5) Interferência no metabolismo celular: As sulfonamidas associadas ao trimetropim bloqueiam etapas na produção de folato do microrganismo, um elemento fundamental para a síntese de DNA e RNA, desta forma impedem que os processos intracelulares ocorram (DZIDIC et al., 2008).

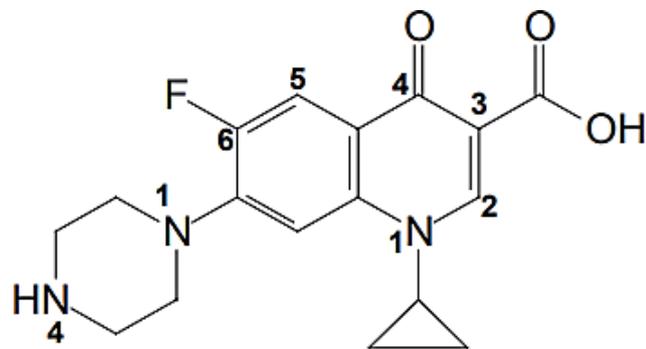
Para adequada atuação destes mecanismos os antimicrobianos necessitam de uma pronta difusão tecidual, os fatores locais. Secreção ou necrose podem reduzir o efeito deles inativando-os, como também levar em conta a concentração efetiva da preparação no local da infecção.

Na medicina veterinária, o tratamento de otite canina aborda o uso de antimicrobianos, incluindo aminoglicosídeos, quinolonas, amoxicilina associado ao ácido clavulanato e

cefalosporinas, mas o uso incorreto ou prolongado desses medicamentos vem resultando na multirresistência bacteriana, já confirmada para os medicamentos eritromicina, penicilina, neomicina e sulfa, que apresentam baixa eficácia, ao contrário da ciprofloxacina e tobramicina que mostraram maior capacidade de inibir o crescimento bacteriano nesta patologia (SANTOS et al., 2019).

A ciprofloxacina (Figura 3) é uma fluoroquinolona bactericida, bastante usada em tratamento das otites em cães por agir na inibição tanto de bactérias gram-negativas (*Enterobacteriaceae* e *Pseudomonas*) quanto gram-positivas (*Staphylococcus* spp. e *Streptococcus* spp.). Este fármaco é aproximadamente quatro vezes mais ativo na inibição destes microrganismos comparado as fluorquinolonas similares (ofloxacina, norfloxacina, enoxacina e pefloxacina) (MANSANO et al., 2012).

**Figura 3** - Estrutura química da ciprofloxacina.



Fonte: MANSANO et al., 2012

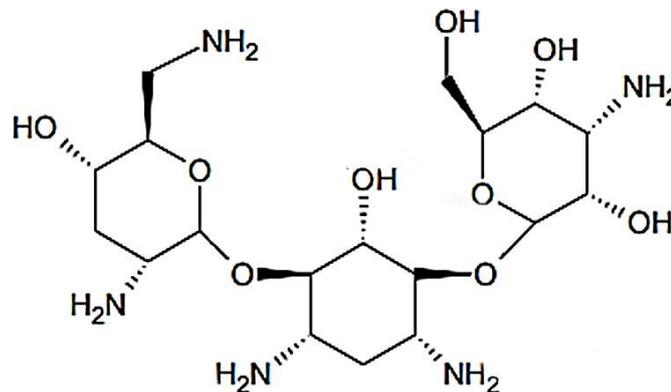
Sua farmacocinética é semelhante à das outras fluoroquinolonas, nos cães o uso entre 5 - 15mg/kg de 12/12 horas sistêmica distribui-se rapidamente nos tecidos periféricos, fluidos biológicos e atingem concentrações muitas vezes superiores às encontradas no soro ou plasma, sendo absorvida para circulação sistêmica até 80% da dose ingerida, mas a administração concomitante com aditivos contendo sais de magnésio ou alumínio reduzem esta biodisponibilidade, devido à formação de quelatos com esses cátions (ZIMMERMANN, 2015). É administrado ainda a 0,35%, 12/12 horas ou 24/24 horas como solução otológica. Dentre seus efeitos colaterais, podem-se destacar: anorexia, vômito, convulsões, aumento da pressão intracraniana, tremores e depressão (FDA, 2004).

Este fármaco é hidrofílico, resiste obstinadamente à ambientes anaeróbicos e sua eficácia contra microrganismos em ambientes de elevadas temperaturas é reduzida (LINDBERG et al., 2006). Ele é um potencial contaminador ambiental, por seu uso exagerado, identificando-se concentrações-traço do fármaco nas estações de tratamento de esgotos, águas superficiais e

efluentes hospitalares, com sua alta taxa de adsorção a partículas sólidas em lodos ativados, solos e sedimentos (TOLLS, 2001).

A tobramicina (Figura 4) é um aminoglicosídeo bactericida, solúvel em água, higroscópica, estável por longos períodos em ambientes com PH entre 1 e 11, e com temperaturas entre 5 – 37 C, assim como a ciprofloxacina, é bastante usada em otite canina inibindo principalmente as bactérias gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*) (ORGÒVAN, NOSZÁL, 2012).

**Figura 4** – Estrutura química da tobramicina.



Fonte: ORGÒVAN, NOSZÁL, 2012.

A utilização deste fármaco em cães pode ser de 2mg/kg, de 8/8 horas, devendo ser usado de maneira restrita e em ocasiões limitadas, pois possui uma estreita margem terapêutica que pode provocar um efeito nefrotóxico, ototóxico e neurotóxico (GAINZA LAFUENTE et al., 2016). É utilizada na concentração de 0,35% em solução otológica de 12/12 horas.

O protocolo terapêutico para a doença otológica com uso de antimicrobianos alopáticos, mesmo tendo eficácia, podem causar problemas sistêmicos, principalmente se houver perfuração timpânica e/ou ulcerações do canal auditivo. Além disso, a maioria dos medicamentos antimicrobianos otológicos podem ser ototóxicos para as estruturas do conduto auditivo externo e interno, causando distúrbios de equilíbrio e perda auditiva (TULESKI, 2007).

Como também, os microrganismos patogênicos bacterianos do conduto auditivo vêm adquirindo multirresistência aos antimicrobianos, isso é graças as mutações cromossômicas e modificações na estrutura da membrana plasmática que bloqueiam os agentes ativos dos medicamentos de insensibilizar a bactéria, que ocorre por conta do mau uso destes medicamentos, que fazem com que gêneros bacterianos se tornem resistentes até às novas drogas que estão sendo produzidas no mercado (PAZIAN, SASS, 2006).

Estas questões mostram que as plantas medicinais são uma boa opção para curar enfermidades microbianas otológicas, pois além de proporcionar uma atividade bioativa medicinal são mais acessíveis, eficazes em doses recomendadas, algumas até mais seguras devido aos efeitos colaterais serem de menor intensidade e não demandam de valores tão altos comparados com a maioria dos medicamentos alopáticos (REMPEL et al., 2019).

## 2.6. RESISTÊNCIA ANTIMICROBIANA

A resistência dos microrganismos aos antimicrobianos pode ser proveniente de uma característica intrínseca bacteriana que leva a resistir à ação do antibiótico resultando na formação de uma característica estrutural ou funcional inerente de dada espécie (BLAIR et al., 2015); pode ser adquirida através de mutações do microrganismo que ocorrem durante uma replicação celular ou indução de agentes mutagênicos (radiações ionizantes e não ionizantes, agentes alquilantes, ou reações oxidativas) (BAPTISTA, 2013); ou adquirida pela troca de material genético exógeno com genes de resistência presente em outros microrganismo através dos mecanismos de transferência gênica horizontal (conjugação bacteriana, transformação e transdução) (COSTA, JUNIOR, 2017; DZIDIC et al., 2008). Dessa forma, apenas os resistentes aos agentes antimicrobianos dentro de uma comunidade microbiana são selecionados (GUSTAVO, 2008).

O uso indevido de antimicrobianos não se restringe apenas ao médico humano ou veterinário, pois são disponíveis no mercado em grande diversidade de produtos (sabonetes, detergentes, cremes dentais, cremes.) favorecendo diariamente a seleção de cepas resistentes no cotidiano da sociedade, tudo isso em função da falsa imagem de proteção contra os germes que esses produtos transmitem em suas campanhas publicitárias, agravando os riscos de infecções resistentes de agentes microbianos (MEIRELES, 2008).

A resistência microbiana é um problema de saúde pública junto a outros fatores e dos sistemas de saúde de todo o mundo, segundo a World Economic Forum Global Risks. A resistência a antimicrobianos está na lista como uma das grandes ameaças à saúde humana dando assim bastante relevância para promoção de pontos estratégicos de ação que contemplem desde a natureza das doenças, os procedimentos terapêuticos usados, os fatores ambientais, políticos e socioeconômicos relevantes a esta questão, salientando de que não há solução definitiva para inibir a resistência microbiana por causa da dinamicidade da evolução biológica destes organismos (BLAIR et al., 2015).

### 2.6.1. Resistência em cocos gram-positivos

As penicilinas são do grupo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos que detêm de uma estrutura central em comum (anel  $\beta$ -lactâmico) e podem ser naturais ou semissintéticas. Os  $\beta$ -lactâmicos inativam as proteínas fixadoras de penicilina (PBPs - *Protein Binding Penicilin*), que são enzimas que catalisam os estágios finais da construção da parede bacteriana. Os microrganismos do gênero *Staphylococcus* spp. desenvolvem resistência aos  $\beta$ -lactâmicos de duas maneiras: expressão de enzimas  $\beta$ -lactamases ou por alteração de suas PBPs (CONSTANT, CONSTANT, 2015).

As  $\beta$ -lactamases são enzimas que hidrolisam o anel  $\beta$ -lactâmico, inativando o antimicrobiano, codificadas no gene *blaZ*, geralmente localizado em plasmídeos, ela tem sua regulação controlada pelos genes *blaR1* (antirrepressor) e *blaI* (repressor). O gene *blaI* codifica um repressor proteico que bloqueia o acesso da RNA polimerase ao sítio promotor de *blaZ*-*blaR1*-*blaI* (CLARKE, DYKE, 2001). Nas estirpes de *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), ocorre produção de uma PBP alterada, a PBP2a ou PBP2, que possui baixa afinidade pelos  $\beta$ -lactâmicos. A produção da PBP2a associa a aquisição do gene *mecA*, que é ausente em *S. aureus* suscetíveis à meticilina (BESSA, LARANJEIRA, 2021).

A resistência à vancomicina por *S. aureus* (VRSA - *Vancomycin-Resistant Staphylococcus aureus*) ocorre pelo fenótipo *vanA* no transposon Tn1546 que foi adquirido por transferência horizontal de genes de um *Enterococcus* spp. Este transposon contém nove genes que em conjunto dão a resistência à vancomicina: as ORF1 e ORF2 codificam as enzimas que geram os movimentos do transposon; *vanR* e *vanS* são os genes de regulação; *vanH* codifica a desidrogenase importante na redução de piruvato a D-Lactato (D-Lac); o gene *vanA* produz uma enzima responsável pela ligação de D-Ala-D-Lac, depois incorpora aos precursores da parede; *vanX* codifica a D,D-dipeptidase, responsável pela quebra da ligação D-Ala-D-Ala; *vanY* codifica a D,D-carboxipeptidase e remove os resíduos de D-Ala-D-Ala da parede celular e dos precursores (GONZALEZ et al., 1998).

*Streptococcus* spp. possui seis tipos de PBPs (1a, 1b, 2a, 2b, 2x e 3) e seu mecanismo de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos ocorre quando altera uma ou mais dessas PBPs, diminuindo a afinidade de ligação com o antimicrobiano. Essas alterações ocorrerem por sucessivas mutações que incluem a transferência de DNA pelo processo de transformação, recombinando os genes que codificam as PBPs e parte dos genes próprios, 20% do DNA ou 10% de aminoácidos, é substituído por fragmentos de genes homólogos de outras bactérias, caracterizando os chamados genes mosaico (HAKENBECK et al., 2012). O nível de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos depende da proporção de qual parte do gene sofre a mutação, sendo a 1a, 2x e 2b normalmente as mais alteradas. As mutações em 2x e/ou 2b conferem baixa resistência, enquanto que

mutações em 1a conferem alta resistência, mas para ocorrerem precisam que 2x e/ou 2b já estejam alteradas (MOTT, 2016; BESSA, LARANJEIRA, 2021).

Em *Enterococcus* spp., já foram detectados os genes de resistência antimicrobiana erm(B), vanC-1, aph(3')-IIIa, ant(6)-Ia, vanB, vanA, aac(6)-Ie-aph(2'')-Ia, erm(A) e tet(M). Essa resistência, aos  $\beta$ -lactâmicos, é estudada principalmente nas espécies *Enterococcus hirae* e *Enterococcus faecium* consistindo na produção de uma PBP com baixa afinidade para este grupo farmacológico, a PBP5, que é codificada no gene *pbp5* localizado no cromossomo bacteriano (POETA et al., 2007). A expressão da PBP5 promove resistência intrínseca de baixo nível, sendo alto apenas com a hiperprodução de PBP5 ou por mutações no gene *pbp5*, diminuindo ainda mais a afinidade da PBP5 para o antimicrobiano.

### 2.6.2. Resistência em bacilos gram-negativos

A ausência de novos antimicrobianos para as bactérias Gram-negativas e o surgimento de mecanismos de resistência que eliminam as opções terapêuticas disponíveis para o tratamento de enfermidades causadas por enterobactérias multirresistentes. (PINTO et al., 2014).

Os mecanismos de resistência em enterobactérias, como a produção de  $\beta$ -lactamases de espectro expandido (*extended-spectrum  $\beta$ -lactamase* - ESBL), metalo- $\beta$ -lactamases e carbapenemases, são mediados principalmente por elementos genéticos móveis, como plasmídeos (POTTER et al., 2016), o que justifica a preocupação com o isolamento de enterobactérias resistentes a antimicrobianos, uma vez que existe a possibilidade de contaminação e posterior colonização de indivíduos por esses microrganismos (LEE et al., 2010), assim como a transferência de plasmídeos e *integrons* contendo elementos de resistência antimicrobiana no intestino (HUDDLESTON, 2014).

Dentre os mecanismos de resistência aos carbapenêmicos, a produção de carbapenemases, seja por sua eficiência hidrolítica, pela codificação por genes localizados em elementos genéticos móveis ou pela sua rápida disseminação, tem o impacto mais significativo na saúde (PINTO et al., 2014). As carbapenemases, AmpC e metalobetalactamases, que conferem resistência aos betalactâmicos ocorrem mais frequentemente em *Klebsiella* spp., *Enterobacter* spp., *Escherichia* spp., *Serratia* spp., *Citrobacter* spp., *Salmonella* spp., *Proteus* spp. e *Morganella* spp. (ANVISA, 2008). As  $\beta$ -lactamases AmpC são mediadas por plasmídeos  $\beta$  que pertencem às famílias CMY, FOX e DHA (JACOBY, 2009).

Modificações nas porinas é caracterizado como outro mecanismo de resistência. Para acessar as PLPs no interior da membrana plasmática, os  $\beta$ -lactâmicos devem se difundir na parede (o que é muito difícil, já que são moléculas pouco lipofílicas) ou atravessar canais

chamados de porinas. Algumas enterobactérias, por exemplo, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli*, apresentam resistência aos carbapenêmicos devido à perda da expressão das porinas. A perda de porinas também está associada à resistência aos antimicrobianos Imipenem e Meropenem em *Pseudomonas aeruginosa* e *Acinetobacter baumannii* (BABIC et al., 2006).

As bombas de efluxo são outro tipo de resistência e são capazes de exportar uma grande variedade de substratos do periplasma para o meio ambiente, sendo um importante determinante da multirresistência em muitos microrganismos gram negativos, especialmente *P. aeruginosa* e *Acinetobacter* spp. e funcionam expulsando os antimicrobianos do espaço periplásmico para fora da célula (SHAHID et al., 2009).

A cápsula da bactéria Gram negativa é um mecanismo de defesa bacteriano e um dos seus determinantes genéticos extraintestinais, o gene kpsMTII. É uma estrutura polisacarídica que protege a bactéria do sistema imune do hospedeiro, inibindo a fagocitose, além de estar associada também à aderência (BIEN, SOKOLOVA, BOZKO, 2012).

Esses mecanismos de ação podem justificar várias ocorrências de perfis de resistências em animais com otites conforme descrito.

Guterres (2020) realizou uma investigação do período de 2009 a 2019, no Laboratório Regional de Diagnóstico (LRD) da Faculdade de Veterinária da Universidade Federal de Pelotas e o perfil de resistência dos isolados bacterianos por meio de 4.720 laudos de cães emitidos no período em que, destes, 197 laudos microbiológicos corresponderam a casos de enfermidade otológica ocasionadas por agentes diversos. No período avaliado, 23 cães apresentaram *Pseudomonas* spp., como agente etiológico de otite, correspondendo a 11,7% onde foi detectada a resistência de *Pseudomonas* spp. aos fármacos beta-lactâmicos foi expressiva, com 87% de resistência à amoxicilina com clavulanato, cefalotina, cefalexina e oxacilina, seguido de 84,6% para ampicilina e 15,4% para ceftriaxona, sendo a média de resistência para outros fármacos foi de 73,9% para fluorquinolonas e 52,2% para sulfonamidas e aminoglicosídeos.

Cardoso et al. (2011) em um estudo sobre dermatopatias, realizado com 257 cães atendidos no Hospital Veterinário (HV) da Universidade Estadual do Norte do Paraná (UENP), Bandeirantes-PR, constataram a prevalência de 17,61% de otite externa nos animais analisados. Embora seja recorrente, a otite externa encontra como um dos seus principais entraves a resistência aos antimicrobianos relacionada à pressão seletiva exercida pelo uso intenso e indiscriminado de medicamentos (FERREIRA, 2010).

Penna et al. (2011) observaram em um experimento realizado no Rio de Janeiro, Brasil, com 528 amostras de otite externa canina que espécies do gênero *Staphylococcus* (*S. intermedius*, *S. schleiferi*, *S. aureus*, *S. epidermidis* e *S. simulans*) apresentaram resistência pelo menos há um antimicrobiano, sendo a grande maioria multirresistente, com destaque para amoxicilina quando utilizada sozinha, neomicina e eritromicina. Weese e Van (2010) entre os diversos fatores de virulência relacionados aos estafilococos, destaca-se a resistência à meticilina, que é expressa pelo gene *mecA*, que confere resistência também a outros antimicrobianos  $\beta$ -lactâmicos. Esta resistência é determinada pela alteração da enzima alvo dos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos, a qual produz uma nova enzima com baixa afinidade pelo antibiótico, codificada pelo gene *mecA*, responsável pela transcrição da proteína 2a (PB2a), que reduz a sensibilidade destas bactérias aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos.

*Pseudomonas* spp. é um microrganismo bacteriano Gram-negativo de maior prevalência nas otites caninas, causando um quadro clínico infeccioso otológico desafiador quanto ao seu tratamento, isso se dá ao fato do patógeno possuir resistência intrínseca aos antimicrobianos e fácil multiplicação em conduto auditivo com inflamação crônica (NETO, LOPES, 2016). A resistência a múltiplas drogas tem sido observada em microrganismos isolados de cães, com 34,9% de resistência do gênero *Pseudomonas* spp. a três ou mais fármacos (OLIVEIRA et al., 2012). O gênero *Pseudomonas* spp. é isolado com frequência na clínica veterinária em infecções cutâneas de cães, principalmente nos casos de otite externa e média (ARAI, 2013).

Marconi (2019), verificando a ocorrência de *Pseudomonas aeruginosa* em um total de 64 isolados de *P. aeruginosa* de otite externa de cães de companhia, averiguou a resistência à colistina, norfloxacin, gentamicina, amicacina, ciprofloxacina, levofloxacina, cefepima, aztreoname tobramicina, imipenem, piperaciclina/tazobactam, cefepima, ceftazidima e piperaciclina. Esta bactéria pode desenvolver resistência a antimicrobianos através da aquisição de genes de resistência em seus plasmídeos ou através de processos mutacionais que alteram a expressão e/ou função de mecanismos codificados cromossomicamente. *P. aeruginosa* apresenta resistência intrínseca a vários antimicrobianos como os  $\beta$ -lactâmicos (exceto monobactam e carbapenemos), as cefalosporinas de primeira e segunda geração, as tetraciclina, o cloranfenicol e os macrolídeos. Isto ocorre devido a uma combinação de baixa permeabilidade da sua membrana externa e sistemas de bomba de efluxo.

Entre 2009 e 2013, Santos et al. (2019) conduziram um estudo observacional e descritivo com o uso de dados clínicos e microbiológicos de cães atendidos no Hospital Veterinário de Uberaba (HVU), Uberaba, Minas Gerais, Brasil. Foi verificada a prevalência de *Staphylococcus*

coagulase negativa (StCN), *Staphylococcus* coagulase positiva (StCP), *Proteus* spp., e *Pseudomonas aeruginosa*. Também foi identificada frequente multirresistência em *P. aeruginosa* e *Proteus* spp, os quais apresentaram elevada resistência para neomicina, cefalexina e azitromicina. *Proteus* spp. e outras enterobactérias produzem enzimas que promovem resistência a alguns antimicrobianos beta-lactâmicos, incluindo cefalosporinas e penicilinas. Cepas que são resistentes a vários os antimicrobianos neste grupo são considerados produtores de beta lactamases de espectro estendido (ESBL).

## REFERÊNCIAS

- ALENCAR, E. M.; CAJAIBA, R. L.; MARTINS, J. S. C.; CORDEIRO, R. S.; SOUSA, E. S.; SOUSA, V. A. Estudo etnobotânico do conhecimento e uso das plantas medicinais no município de Buriticupu, Maranhão, Brasil. **Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais**, v.10, n.6, p.328-338, 2019.
- ALI, S. A.; HASAN, K. A.; BIN, A. S. I. F. H.; ABBASI, A. Environmental enterococci: I. Prevalence of virulence, antibiotic resistance and species distribution in poultry and its related environment in K arachi, P akistan. **Letters in Applied Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 423-432, 2014.
- ALMEIDA, M.S.; SANTOS, S.B.; MOTA, A.R.; SILVA, L.T.R.; SILVA, L.B.G.; MOTA, R.A. 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.
- ALVES, R. A. H. **Triagem fitoquímica e ação antimicrobiana in vitro do extrato de Spondias mombin L. frente às bactérias Staphylococcus aureus, a pseudomonas aeruginosa e a escherichia coli.** Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, RN, 43 F. : Il. 2017.
- ANDRADE, M. P. **Tradição e modernidade: estudo sobre as representações e práticas culturais da benzeção.** Dissertação (Mestrado em Extensão Rural) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 135 F. : Il. 2019.
- ARAI, L. R. **Resistência aos antimicrobianos, pesquisa de exotoxinas e relação genética de Pseudomonas aeruginosa isoladas de otite externa e piodermite canina.** Tese (Doutorado em Clínica e Reprodução Animal), Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2013. 105p.
- ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T.; PEARSON, M. M. Patogênese da infecção por *Proteus mirabilis*. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Módulo 2 - Gram-negativos Fermentadores. Brasília: Ministério da Saúde, 2008.
- ASOMIE, J.; AINA, A.; OWOLO O.; OLUKANNI, O.; OKOJIE, D.; AINA, F.; MAJOLAGBE, O.; FEYISARA BANJI, A. Biogenic synthesis and characterization of Silver nanoparticles from seed extract of *Spondia mombins* and screening of its antibacterial activity. **International Journal Nano Dimension**. v.12, n.2. p. 175-185. 2021.
- BABIC, M.; HUJER, A. M.; BONOMO, R. A. What's new in antibiotic resistance? Focus on beta-lactamases. **Drug Resistance Updates**, v. 9, n. 3, pp. 142-156, 2006.
- BAJWA, J. Otite externa canina: tratamento e complicações. **Canine Veterinary Journal**, v. 60, n. 1, p. 97-99. 2019.

- BALBINO, M. L. C.; BALBINO, E. C. O descarte de medicamentos no Brasil: Um olhar socioeconômico e ambiental do lixo farmacêutico. **Revista Brasileira de Estudos Jurídicos–Faculdades Santo Agostinho**, v. 7. n. 1. p. 87-100. 2017.
- BAPTISTA, M. G. F. M. **Mecanismos de Resistência aos Antibióticos**. monografia (Dissertação de Mestrado) - Curso de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologia, Lisboa. 2013. 42p.
- BATISTA, F. T.; LACERDA, G. D.; SILVA, J. R. S.; RODRIGUES, L. P. T.; FEITOSA, T. P.; MUSTAFA, V. S. O uso de plantas medicinais na medicina veterinária – Riscos e benefícios. **Revista Científica do Curso de Medicina Veterinária**, v.4, n 2. p. 62-74. 2017.
- BAUMANN, S. S. R. T.; BRÍGIDA, C. A. S.; SILVA, J. B. S.; LIMA, P. S.; RABELO, L. K. L.; PIRES, E. C.; MAESTRI, M. P.; AQUINO, M. G. C. Espécies arbóreas tóxicas presentes na arborização urbana do município de Santarém, Pará. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 3, p. 342-351, 2019.
- BESSA, V. C.; LARANJEIRA, B. J. Bacterial resistance mechanisms in gram positive cocci. **Revista Científica UNIFAGOC-Saúde**, v. 5, n. 1, p. 40-48, 2021.
- BIEN, J.; SOKOLOVA, O.; BOZKO, P. Role of Uropathogenic Escherichia coli Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. **International Journal of Nephrology**, 15 pag, 2012.
- BLAIR, J. M.;WEBBER, M. A.; BAYLAY, A. J.; OGBOLU, D. O.; PIDDOCK, L. J. V. Molecular Mechanisms of Antibiotic Resistance. **Nature**, v. 13, n. 1, p. 42- 51, 2015.
- BLAKE, J.; KEIL, D.; KWOCZKA, K.; PALMA, K.; SCHOFIELD, J. Evaluation of a single-administrationototopical treatment for canine otitisexterna: a randomised Trial. **Veterinary Record Open**. v. 4, n. 1, e000219, 2017.
- BOHNEBERGER, G.; MACHADO, M. A.; DEBIASI, M. M.; DIRSCHNABEL, A. J.; RAMOS, G. O. Fitoterápicos na odontologia, quando podemos utilizá-los?. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 2, n. 4, p. 3504-3517, 2019.
- BOURÉLY, C.; CAZEAU, G.; JARRIGE, N.; LEBLOND, A.; MADEC, J. Y.; HAENNI, M.; GAY, E. Antimicrobial resistance patterns of bactéria isolated from dogs with otitis. **Epidemiol Infect.** v. 147, e121, p.1-10. 2019.
- BRASIL. Decreto nº. 5813, de 22 de junho de 2006. Aprovação da Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília, Ministério da Saúde, 2006a.
- BRASIL. Portaria nº. 971, de 03 de maio de 2006. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Brasília, Ministério da Saúde, 2006b.
- BRANDÃO, M. G. L.; ACURCIO, F. A.; MONTEMOR, R. L. M.; MARLIÈRE, L. D. P. Complementary/Alternative Medicine in Latin America: Use of Herbal Remedies among a Brazilian Metropolitan Area Population. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**. v.3, n.1, 2006.

- BUGDEN, D. Identification and antibiotic susceptibility of bacterial isolates from dogs with otitis externa in Australia. **Aust Vet Jour.** v. 91, n. 1-2, p. 43-46, 2007.
- CARDOSO, M. J. L. et al. Dermatopatias em cães: revisão de 257 casos. **Archives of Veterinary Science**, p. 66-74, 2011.
- CARVALHO, W. A.; LEMÔNICA, L. Mecanismos centrais de transmissão e de modulação da dor. Atualização terapêutica. **Brazilian Journal of Anesthesiology**, v. 48, n. 3, p. 221-241, 2020.
- CHAN, W. Y. et al. Atividade antimicrobiana in vitro de sete adjuvantes contra patógenos comuns associados à otite externa canina. **Dermatologia Veterinária**, v. 30, n. 2, pág. 133-138, 2019.
- CHERMPRAPAI, S.; EDERVEEN, T. H. A.; BROERE, F.; BROENS, E. M.; SCHLOTTER, Y. M.; SCHALKWIJK, S. V.; BOEKHORST, J.; VAN HIJUM, S. A. F. T.; RUTTEN, V. P. M. G. The bacterial and fungal microbiome of the skin of healthy dogs and dogs with atopic dermatitis and the impact of topical antimicrobial therapy, na exploratory study. **Vet Microbiol.** v. 229, p. 90-99, 2019.
- COELHO, K. M.; JUNIOR, H. L. Fitoterapia racional: riscos da automedicação e Terapia alternativa. **Revista Saberes**, v. 3, p. 35-44, 2015.
- COLE, L. K. **Infecções tegumentares** in GREENE, C. E. **Doenças infecciosas em cães e gatos**. 4ª edição. Rio de Janeiro, p. 1904-1932, 2015.
- COSTA, A. L. P. CAMPOS, M. B.; BARBOSA, L. P. J. L.; BEZERRA, R. M.; BARBOSA, F. H. F. Análise qualitativa fitoquímica e do potencial antimicrobiano do extrato bruto de casca de *Bertholletia excelsa Humb.* e *Bomplé (Lecyctidaceae)* frente a microrganismos gram-positivos. **Ciência Equatorial**, v.22, n. 1, p. 26-34, 2012.
- COSTA, A. L. P.; JUNIOR, A. C. S. S. Resistência bacteriana aos antibióticos e Saúde Pública: uma breve revisão de literatura. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 2, p. 45-57, 2017.
- COSTA, P. S.; SOUZA, E. B.; BRITO, E. H. S.; FONTENELLE, R. O. S. Atividade antimicrobiana e potencial terapêutico do gênero *Lippia* sensu lato (Verbenaceae). **Hoehnea**, v. 44, n. 2, p. 158-171, 2017.
- CUSCÓ, A.; SÁNCHEZ, A.; ALTET, L.; FERRER, L.; FRANCINO, O. Individual Signatures Define Canine Skin Microbiota Composition and Variability. **Front Vet Sci.** v. 4, n. 6, p. 4-6, 2017.
- CLARKE, S. R.; DYKE, K. G. H. The signal transducer (BlaRI) and the repressor (BlaI) of the *Staphylococcus aureus*  $\beta$ -lactamase operon are inducible. **Microbiology.** v.147, n 4 p 803-810, 2001.
- CONSTANT, J. M. C.; CONSTANT, A. B. L. **Antibióticos e quimioterápicos antimicrobianos**. São Paulo: Sarvier, ed. 2, p. 381, 2015.

CUNHA, A. P. C. **Emprego das plantas aromáticas desde as antigas civilizações até o presente.** Disponível em: <[http://www.oleoessencial.com.br/OEMPREGODASPLANTAS\[1\].pdf](http://www.oleoessencial.com.br/OEMPREGODASPLANTAS[1].pdf)>. Acesso em: 30 de jun. de 2021.

DANTAS, T. D. P. D., FEIJÓ, F. M. C., ALVES, N. D. *et al.* *Spondias mombin* L. decoction utilization as antiseptic in cats submitted to castration. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 57, n. 2, 2020.

DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J.-P.; PAGÈS, J.-M. *Enterobacter spp.*: atualização sobre taxonomia, aspectos clínicos e resistência antimicrobiana emergente. **Revisões de microbiologia clínica**, v. 32, n. 4, pág. e00002-19, 2019.

DIAS, L. L. S.; SANTOS, M. A. B.; PINTO, C. D. B. S. Regulação contemporânea de preços de medicamentos no Brasil-uma análise crítica. **Saúde em Debate**, v. 43, n.121, p. 543-558, 2019.

DZIDIC, S.; SUSKOVIC, J.; KOS, B. Antibiotic Resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects. **Food Technology and Biotechnology**. v. 46, n. 11, p. 11-21, 2008.

ELMER, K.; WASHINGTON, W. J.; STEPHEN, A.; WILLIAM, J.; GARY, P.; PAUL, S.; GAIL, W. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, ed. 6, p. 1565, 2012.

EMYINUMARU, F.; SILVA, A. S.; SOARES, A. D. S.; SCHUELTER-TREVISOL, F. Profile and appropriate use of antibiotics among children in a general hospital in southern Brazil. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 37, p. 27-33, 2018.

ESTEVES, C. O. Medicamentos fitoterápicos: prevalência, vantagens e desvantagens de uso na prática clínica e perfil e avaliação dos usuários. **Revista de Medicina**, v. 99, n. 5, p. 463-472, 2020.

FDA – Food and Drug Administration. **Drug Safe and Availability. CIPRO® FULL PRESCRIBING INFORMATION**. Initial U.S. Approval: 1996. Rockville, 2004. Disponível em: <[http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda\\_docs/label/2005/019537s057,020780s0191bl.pdf](http://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2005/019537s057,020780s0191bl.pdf)>. Acesso em: 04 de jul. de 2021.

FERNANDES, B. F.; GONÇALVES, H. R.; GUIMARÃES, M. R.; ALVES, A. A.; BIESKI, I. G. C. Estudo etnofarmacológico das plantas medicinais com presença de saponinas e sua importância medicinal. **Revista da Saúde da AJES**, v. 5, n. 9, p. 16 – 22, 2019.

FILIPO, C. D.; FIȚ, N.; BOUARI, C. M.; BUZURA-MATEI, I.; NADĂȘ, G. Microbiological study of external otitis in dogs from North Rhine-Westphalia, Germany. In: **Medicină veterinară materiale le Simpozionului Științific Internațional**. V. 49, 2018.

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

- FREITAS, R. F. D.; CANELLI, A. P.; ARO, A. A.; SARTORATTO, A.; FRANZINI, C. M.; GÓES, V. F. F. *In vitro* evaluation of the efficacy of cajá (*Spondias mombin* L.) and soursop (*Annona muricata* L.) hydroalcoholic extract on oral microorganisms. **Brazilian Journal of Development.**, Curitiba, v. 6, n. 9, p. 66772-66793, 2020.
- GAINZA LAFUENTE, E. J.; VILLULLAS RINCÓN, S.; IBARROLA MORENO, O.; GAINZA LUCEA, G.; HERRÁN MARTÍNEZ, E.; AGUIRRE ANDA, J. J.; POZO PEREZ, Á.; PEDRAZ MUÑOZ, J. L.; ESQUISABEL ALEGRÍA, A.; MORENO-SASTRE, M.; PASTOR NAVARRO, M.; VIÑAS CIORDIA, M.; VINUESA AUMEDES, M. T.; BACHILLER, D. Nanopartícula lipídica de tobramicina. art.21, n. 3, 2016.
- GARCÍA-SOLACHE, M.; RICE, L. B. The *Enterococcus*: a model of adaptability to its environment. **Clinical microbiology reviews**, v. 32, n. 2, p. e00058-18, 2019.
- GARCIA, W. J.; FREITAS, E. S. Caracterização de resistência e sensibilidade a antimicrobianos de bactérias isoladas em otite externa de cães na cidade de Cascavel-Paraná. **Arquivos Brasileiros de Medicina Veterinária FAG**, v. 2, n. 2, p. 202-211, 2019.
- GAIBANI, P. S.; AMBRETTI, S.; FARRUGGIA, P.; BUA, G. A.; BERLINGERI, A.; TAMBURINI, M. V. et al. Surto de *Citrobacter freundii* transportando VIM-1 em um Hospital Italiano, identificado durante as ações de triagem de carbapenemas, **Int J Infect Dis**, v. 17, n. 9, e714-e717, 2013.
- GHELLER, B. G.; MEIRELLES, A. C. F.; FIGUEIRA, P. T.; HOLSBACH, V. Bacterial pathogens found in dogs with external otitis and its susceptibility profiles to several antimicrobial. **Pubvet**. v. 11, n. 2, p.159-167, 2017.
- GIORDANI, C.; MATOS, C. B.; GUTERRES, K. A.; SILVA, C. C.; SANTIN, R.; SCHUCH, L. F. D.; CLEFF, M. B. Plantas com potencial medicinal e tóxico em comunidade atendida pelo Ambulatório Veterinário-UFPel. **R. bras. Ci. Vet.**, v. 23, n. 3-4, p. 126-132, 2016.
- GONZÁLEZ, I.; GEORGIU, M.; ALCAIDE, F.; BALAS, D.; LIÑARES, J.; LA CAMPA, A. G. **Fluoroquinolone resistance mutations in the parC, parE, and gyrA genes of clinical isolates of viridans group Streptococci.** Antimicrob Agents Chemother. v. 11, n. 42, p. 2792–2798, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC105945/pdf/ac002792.pdf>>. Acesso em: 01 de julho de 2021.
- GOTH, G. M. External ear disease in dogs and cats. **Veterinary Focus**. v. 21, n. 3, 2011.
- GRIBNER, C; RATTMANN, Y. D.; GOMES, E. C. Fitoterápicos na Atenção Básica à Saúde: uma Experiência na Região Sul do Brasil. **Visão Acadêmica**, v. 20, n. 2, 2019.
- GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a Descoberta de Novos Agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667- 679, 2010.

GRIMONT, P. A. D.; GRIMONT, F. Genus *Pantoea*, In D. J. Brenner, N. R. Krieg, and J. T. Staley (ed.), **Bergey's manual of systematic bacteriology**, 2nd ed., vol. 2. The *Proteobacteria*. Springer-Verlag, New York, NY. p. 713-720. 2005.

GRIMONT, F.; GRIMONT, P. gênero *enterobacter*. **Procariontes**, v. 6, p. 197-214, 2006

GRIMONT, P.; GRIMONT, F. *Enterobacter*. **Manual de sistemática de archaea e bactérias de Bergey**, p. 1-17, 2015.

GUSTAVO. B. L. **Análise de portadores assintomáticos de staphylococcus aureus no hospital universitário de Brasília**. Monografia (Dissertação de Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Patologia Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, Brasília. 2008. 102p.

GUTERRES, K. **Ocorrência de otite canina por Pseudomonas spp. e sensibilidade dos isolados registrados no Laboratório Regional de Diagnóstico no Período de dez anos**. Science And Animal Health, v. 8, n. 1, p. 55-64, 2020. Disponível em: < <https://periodicos.ufpel.edu.br/ojs2/index.php/veterinaria/article/view/17521>>. Acesso em: 30 de jun. de 2021.

HAENNI, M.; LUPO, A.; MADEC, J. Resistência antimicrobiana em *Streptococcus* spp. **Espectro de microbiologia**, v. 6, n. 2, pág. 6, 2018.

HAMMERUM, A. M. Enterococci of animal origin and their significance for public health. **Clin Microbiol Infect**. v. 18, p. 619–625, 2012.

HAKENBECK, R.; BRÜCKNER, R.; DENAPAITE, D.; MAURER, P. Molecular mechanisms of b-lactam resistance in *Streptococcus pneumoniae*. **Future Microbiology**. v. 7, n.3, p. 395–410, 2012.

HUDDLESTON, J. R. Horizontal gene transfer in the human gastrointestinal tract: potential spread of antibiotic resistance genes. **Infect Drug Resist**. v. 7, p. 167-176, 2014.

JACOBY, G. A. AmpC beta-lactamases. **Clin. Microbiol. Rev**. v. 22, n. 1, p. 161-182. 2009.

JAVED, A.; MASUD, T.; UL AIN, Q.; IMRAN, M.; MAQSOOD, S. Enterocinas de *Enterococcus faecium*, conservantes naturais emergentes de alimentos. **Ann. Microbiol** . v. 61, p. 699–708, 2011.

KARAHAN, M.; CETINKAYA, B. Coagulase gene polymorphisms detected by PCR in *Staphylococcus aureus* isolated from subclinical bovine mastitis in Turkey. **The Veterinary Journal**, v. 174, n. 2, p. 428-431, 2007.

KLAUMANN, P. R.; WOUK, A. F. P. F.; SILLAS, T. Patofisiologia da dor. **Archives of veterinary science**, v. 13, n. 1, p.1-12, 2008.

KUMAR, P.; GHOSH, S.; RATH, D.; GADPAYLE, A. K.; Multidrug resistant *Citrobacter*: na unusual cause of liver abscess. **BMJ Case Rep**. p. 2013, 2013.

- LEE, J.; LEE, C. S.; HUGUNIN, K. M.; MAUTE, C. J.; DYSKO, R. C. Bacteria from drinking water supply and their fate in gastrointestinal tracts of germ-free mice: a phylogenetic comparison study. **Water Res.** v. 44, n. 17, p. 5050-5058., 2010.
- LEONEZ, C. F.; FEIJÓ, F. M. C.; ALVES, N. D. *et al.* Efficacy of the decoction of cashew leaf (*Spondias mombin* L.) as a natural antiseptic in dairy goat matrices. *African Journal of Agricultural Research*, v. 13, n. 13, p. 644-649, 2018.
- LEWIS, D. J.; CHAN, W. H.; HINOJOSA, T.; HSU, S.; FELDMAN, S. R. Mecanismos de patogênese microbiana e o papel do microbioma da pele na psoríase: uma revisão. **Clinics in dermatology**, v. 37, n. 2, pág. 160-166, 2019.
- LIMA, I. P. A. de .; ALVES, R. A. H. .; MAYER, J. de S. L. .; COSTA, M. R. M. .; MENDONÇA, A. K. P. de .; LIMA, E. L. F. de .; LANGASSNER, S. Z. .; DAMETTO, F. R. .; LIMA, K. C. de .; LINS, R. D. A. U. . **Antimicrobial activity of *Spondias mombin* L. aqueous and hydroethanolic extracts on *Enterococcus faecalis* and *Pseudomonas aeruginosa* - an in vitro study.** *Research, Society and Development*, [S. l.], v. 10, n. 1, p. e50710111949, 2021. Disponível em: <<https://www.rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/11949>>. Acesso em: 30 de jun. de 2021.
- LINDBERG, R. H.; OLOFSSON, U.; RENDAHL, P.; JOHANSSON, M. I.; TYSKLIND, M.; ANDERSSON, B. A. V. Behavior of Fluoroquinolones and Thrimethoprim during mechanical, chemical, and active sludge treatment of sewage water and digestion of sludge. **Environ Sci Technol.** v. 40, p. 1042-1048, 2006.
- LPSN, List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature. **Gênero *Enterococcus*.** 2010. Disponível em: <<https://lpsn.dsmz.de/genus/enterococcus>>. Acesso em: 05 de jul. de 2021.
- LOPES, J. F. **Mecanismos de patogenicidade de *Citrobacter rodentium* e a comparação destes com EPEC e EHEC.** Trabalho de conclusão de curso. Universidade Estadual Julio de Mesquita, 2016, 101p.
- LUCAS, R.; CALABRIA, K. C.; PALUMBO, M. I. P. Otopatias, p.779-798. In: LARSSON; C. E.; LUCAS, R. *Tratado de Medicina Externa: dermatologia veterinária.* Interbook, São Paulo. ed., 2016.
- MANSANO, A. S.; OLIVEIRA, L. L. D.; ROCHA, O. Avaliação da toxicidade aguda do antibiótico ciprofloxacina aos cladóceros *daphnia magna* e *ceriodaphnia silvestrii*. **Periódico Eletrônico Fórum Ambiental da Alta Paulista**, v. 8, n. 12, p. 76-88, 2012.
- MARCONI, C. ***Pseudomonas aeruginosa* na otite externa em animais de companhia: resistência aos antimicrobianos.** Tese de Doutorado. Universidade de Lisboa, Faculdade de Medicina Veterinária, p.64, 2019.
- MARIPUU, L.; ERIKSSON, A.; NORNGREN, M. Superantigen gene profile diversity among clinical group A streptococcal isolates. **FEMS immunology and medical microbiology.** v. 54, n. 2, p. 236-244, 2008.

MARQUES, PAOLA ALVARES; SIMÃO, T. A.; MORIYA, M. M.; ANTUNES, V.; OLIVEIRA, C.; DIAS, G. Prescrição farmacêutica de medicamentos fitoterápicos. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 2, n. 1, p. 15-15, 2019.

MCMILLAN, D. J.; BEIKO, R. G.; GEFFERS, R.; BUER, J.; SCHOULS, L. M.; VLAMINCKX, B. J. M.; WANNET, W. J. B.; SRIPRAKASH, K. S.; CHHATWAL, G. S. Genes for the majority of group a streptococcal virulence factors and extracellular surface proteins do not confer an increased propensity to cause invasive disease. **Clinical infectious diseases** : an official publication of the Infectious Diseases Society of America. v. 43, n. 7, p. 884-891, 2006.

MEIRELES, M. A. O. M. **Uso de Antimicrobianos e Resistência Bacteriana: Aspectos Socioeconômicos e Comportamentais e seu Impacto Clínico e Ecológico**. Monografia (Especialização em Microbiologia) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2008. 47p.

MELIÇO-SILVESTRE, A.; CUNHA, J. G. S. Doenças Infecciosas: o desafio da clínica. **Doenças Infecciosas: o desafio da clínica**, p. 1-148, 2008.

MESQUITA, M. O. M.; PINTO, T. M. F.; MOREIRA, R. F. Potencial antimicrobiano de extratos e moléculas isolados de plantas da Caatinga: uma revisão. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, v. 11, n. 2, p. 216-230, 2017.

MEZZELANI, M.; GORBI, S.; REGOLI, F. Produtos farmacêuticos em ambientes aquáticos: evidências de ameaças emergentes e desafios futuros para organismos marinhos. **Pesquisa ambiental marinha**, v. 140, p. 41-60, 2018.

METIBEMU, DS, AKINLOYE, OA, AKAMO, AJ, OJO, D. A.; MORIFI, E.; OMOTUYI, I. O. Carotenoid isolates of *Spondias mombin* demonstrate anticancer effects in DMBA-induced breast cancer in Wistar rats through X-linked inhibitor of apoptosis protein (XIAP) antagonism and anti-inflammation. **Journal Food Biochemistry**. v. 44, n. 12, 2020.

MICHELIM, L. **Abordagem biotecnológica em *Proteus mirabilis***. Tese (doutorado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, caxias do sul - 2014.

MOTT, M. P. **Prevalência de resistência aos antimicrobianos e diversidade genética de *Streptococcus pneumoniae* isolados de doença invasiva e não invasiva**. Dissertação de mestrado. Universidade Federal da Ciência da Saúde de Porto Alegre. 2016, 89p.

NASCIMENTO JÚNIOR, B. J.; TÍNEL, L. O.; SILVA, E. S.; RODRIGUES, L. A.; FREITAS, T. O. N.; NUNES, X. P.; AMORIM, E. L. C. Avaliação do conhecimento e percepção dos profissionais da estratégia de saúde da família sobre o uso de plantas medicinais e fitoterapia em Petrolina-PE, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, n. 1, p. 57-66, 2016.

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

- NEVES, R. C. S. M.; MAKINO, H.; CRUZ, T. P. P. S.; SILVEIRA, M. M.; SOUSA, V. R. F., DUTRA, V.; LIMA, M. E. K. M.; BELLI, C. B. *In vitro* and *in vivo* efficacy of tea tree essential oil for bacterial and yeast ear infections in dogs. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 38, p. 1597-1607, 2018.
- NIEHUES, J.; BONETTI, P.; SOUZA, M. R.; LUNARDI, A.; PIOVEZAN, A. P.; PETERS, R. R. Levantamento etnofarmacológico e identificação botânica de plantas medicinais em comunidades assistidas por um serviço de saúde. **Arquivos Catarinenses Medicina**, v. 40, n.1, p. 34–39, 2011.
- NUNES, J. V. N.; SANTOS, R. C.; MACIEL, L. H.; SILVA, R. E.; LIMA, V. S.; RAMOS, M. L. H.; SILVA, G. C. Aspectos biológicos e terapêuticos do gênero *Microgramma*, família Polypodiaceae. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 7, p. 50403-50416, 2020.
- OLIVEIRA, V. B.; RIBEIRO, M. G.; ALMEIDA, A. C. S.; PAES, A. C.; CONDAS, L. A. Z.; LARA, G. H. B.; FRANCO, M. M. J.; FERNANDES, M. C.; LISTONI, F. J. P. 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.
- ORLEK, A.; ANJUM, M. F.; DOUMITH, M.; ELLINGTON, M. J.; PETO, T.; CROOK, D.; WOODFORD, N.; WALKER, A. S.; PHAN, H.; SHEPPARD, A. E. Classificação de plasmídeos em uma época de sequenciamento de todo o genoma: aplicação em estudos de epidemiologia da resistência a antimicrobianos. **Fronteiras em microbiologia**, v. 8, p. 182, 2017.
- OLIVEIRA, F. E. **Relatório de estágio supervisionado: identificação microbiológica de otite bacteriana em animais de companhia.** Monografia de Graduação, Universidade Federal Rural do Semi-Arido. 2020. 87p.
- OGUEGBULU, N. E.; ABO, A. K.; AFIEROHO, O. E. Comparative Evaluation of the Antimicrobial Activities of some plants used in Natural Medicine – *Spondias mombin*, *Calliaidra portoricensiss*, *Dennettia tripetala*, *Anthocleista djalonensis* and *Croton zambesicus*. **Saudi Journal of Pathology and Microbiology**. p. 263-270. 2020.
- ORGÒVAN. G.; NOSZÁL, B. N. M. R. Analysis and site-specific protonation constants of streptomycin. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 59, p. 78-82, 2012.
- PATERSON, S. **Discovering the causes of otitis externa.** In Practice. ed. S2, v. 38, p.7-11, 2016.
- PAULINO, A. S.; SANTOS, J. V.; ARAÚJO, B. G.; FONSECA, K. A.; MORAES, C. F. Assistência farmacêutica no uso racional de medicamentos em idosos: uma revisão. **BIUS-Boletim Informativo Unimotrisaúde em Sociogerontologia**, v. 24, n. 18, p. 1-19, 2021.
- PAZIAN, G.M.; SASS, Z.F.S. Resistência bacteriana a antimicrobianos. **Revista Cesumar – Ciências humanas e sociais aplicadas**. v. 11, n 1, p. 157-163, 2006.

- PENNA, B.; THOMÉ, S.; MARTINS, R.; MARTINS, G.; LILENBAUM, W. *In vitro* antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis externa in rio de janeiro, Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**. n.42, p.1434-1436, 2011.
- PERRY, L. R.; MACLENNAN, B.; KORVEN, R.; RAWLINGS, T. A. Epidemiological study of dogs with otitis externa in Cape Breton, Nova Scotia. **The Canadian Veterinary Journal**, v. 58, n. 2, p. 168, 2017.
- PINTO, F. M.; SIMA, S. D. M.; BALDIN, C. P.; LIMBERGER, I. I.; SILVA, R. C. F.; ANTICHEVIS, L. C.; VIEIRA, F. J.; RIBEIRO, V. B.; MAGAGNIN, C. M.; ROZALES, F. P.; FALCI, D. R. et al. Prevalência de Carbapenemases em enterobactérias resistentes a carbapenêmicos em quatro hospitais terciários de Porto Alegre. **Clin Biomed Res**, v. 34, n. 1, p. 47-52, 2014.
- POETA, P.; COSTA, D.; IGREJAS, G.; SÁENZ, Y.; ZARAZAGA, M.; RODRIGUES, J.; TORRES, C. Polymorphisms of the *pbp5* gene and correlation with ampicillin resistance in *Enterococcus faecium* isolates of animal origin. **J Med Microbiol**. n. 56, p. 236–240, 2007.
- POTTER, R. F.; D'SOUZA, A. W.; DANTAS, G. The rapid spread of carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae*. **Drug Resist Updat**. v. 29, p. 30-46, 2016.
- PUSEY, P. L.; STOCKWELL, V. O.; RUDELL, D. R. Antibiosis and acidification by *Pantoea agglomerans* strain E325 may contribute to suppression of *Erwinia amylovora*. *Phytopathology*. v. 98, n. 10, p. 1136-1143, 2008.
- RADLINSKY, M.; MASON, D. Diseases of the Ear. In Ettinger, S. & Feldman, E., *Textbook of Veterinary Internal Medicine*. Saunders Elsevier, USA. ed. 7, v. 1, p. 1015- 1024, 2011.
- RAMANAN, P.; BARRETO, J. N.; OSMON, D. R.; TOSH, P. K. *Rothia* bacteremia: a 10-year experience at Mayo Clinic, Rochester, Minnesota. **Journal Clinical Microbiology**. v. 52, p 3184-3189, 2014.
- REMPEL, C.; MACIEL, M. J.; BERGMANN, P. C.; MORÁS, A. P. B.; GOETTENS, C. Efeito antimicrobiano de plantas medicinais: uma revisão de estudos científicos. **Revista Ibero-Americana de Ciências Ambientais**, v. 10, n. 4, p. 57-82, 2019.
- SANTOS, C. A. O.; SILVA, M. W.; SOARES, K. M.; ROLIM, A. K. A.; SILVA, F. V. D.; ANDRADE, K. S.; NASCIMENTO, A. M. V.; MACÊDO-COSTA, M. R. **Antibacterial activity of *Spondias mombin* on superinfecting bacteria in the oral environment**. **Research, Society and Development**, [S. l.], v. 9, n. 12, p. e6691210695, 2020. Disponível em: <<https://www.rsdjournal.org/index.php/rsd/article/view/10695>>. Acesso em: 30 de jun. de 2021.
- SANTOS, D. S.; RODRIGUES, M. M. F. Atividades farmacológicas dos flavonoides: um estudo de revisão. **Estação Científica (UNIFAP)**, v. 7, n. 3, p. 29-35, 2017.
- SANTOS, E. F. ARAÚJO, R. R.; LEMOS, E. E. P.; ENDRES, L. Quantificação de compostos bioativos em frutos de umbu (*Spondias tuberosa* Arr. Câm.) e cajá (*Spondias mombin* L.) nativos de alagoas. **Revista Ciência Agrícola**, v. 16, n. 1, p. 21-29, 2018.

- SANTOS, F. F.; GUIMARÃES, J. P. ESTUDO RETROSPECTIVO DAS OTITES EM CÃES E GATOS ATENDIDOS NO HOSPITAL VETERINÁRIO EM SANTOS/SP. **Ars Veterinaria**, v. 36, n. 3, p. 195-200, 2020.
- SANTOS, J. P.; JÚNIOR, Á. F.; LOCCE, C. C.; BRASÃO, S. C.; BITTAR, E. R.; BITTAR, J. F. F. Eficácia de tobramicina e ciprofloxacina contra isolados bacterianos de otite externa canina em Uberaba, Minas Gerais. **Ciência Animal Brasileira**, v. 20, p. 8-9, 2019.
- SARTORI, S.; LATRONICO, F.; CAMPOS, L.M.S. Sustentabilidade e desenvolvimento sustentável: uma taxonomia no campo da literatura. **Ambiente e Sociedade**, São Paulo, v.17, n. 1, p. 01-22, 2014.
- SCHERER, C. B.; BOTONI, L. S.; COURA, F. M.; SILVA, R. O.; SANTOS, R. D.; HEINEMANN, M. B.; COSTA-VAL, A. P. Frequency and antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs with otitis externa. **Cienc Rural**. v. 48, n. 4, 2018.
- SHAHID, M.; MALIK, A.; ADIL, M.; JAHAN, N.; MALIK, R. Comparison of betalactamase genes in clinical and food bacterial isolates in India. **Journal Infection in Developing Countries**. v. 3, 593–598, 2009.
- SILVA, E. L. V. **Estudo toxicológico não clínico do extrato hidroalcoólico de *Spondias mombin* L.**, Recife, Pernambuco, Brasil. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal De Pernambuco. PE, 76 F. : Il. 2015.
- SILVA, M. S. M.; FERREIRA, F. M. D. Uso racional de antimicrobianos por acadêmicos de um Centro Universitário do norte do Paraná. **Brazilian Journal of Development**, v. 6, n. 10, p. 81223-81236, 2020.
- SILVA, T. M.; MILBRADT, L. L.; ZAMAE, J. C.; FILHO, R. L. A.; OKAMOTO, A. S. Transferência de resistência antimicrobiana entre enterobactérias patogênicas de importância aviária-Impactos em saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v. 21, n. 2, p. 9-20, 2016.
- SIQUEIRA, E. M. **Avaliação do teor de geranina como marcador de um derivado vegetal de *spondias mombin* L. e do seu potencial efeito anti-herpético.** Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Norte. 176p. Saberes, Rolim de Moura, vol. 3, p. 35-44, 2015.
- SOUZA, L. F.; DINIZ, R. S. Prospecção fitoquímica de noz pecan (*Carya illinoensis*). **ANAIS SIMPAC**, v. 8, n. 1, 2018.
- SOUZA, V. R.; LIMA, T. P. B.; BRUM, M. C. M. et al. Avaliação da ação dos extratos das frutas amazônicas murici (*Byrsonima crassifolia*) e taperebá (*Spondia mombin*) sobre a viabilidade celular em células de câncer de ovário parental e resistente à cisplatina, **Editora Atena**, p. 388–416, 2020.
- SOUZA, T. L. **Levantamento etnoveterinário aplicado à caprinocultura em assentamentos rurais de Mossoró – Rio Grande do Norte.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal Rural do Semi-Árido. 2015, 142p.

SOUSA, V. F. O.; BANDEIRA, A. S.; RIBEIRO, M. D. S.; SANTOS, J. J. F.; SANTOS, G. L.; SILVA, R. A.; MARACAJÁ, P. B.; COSTA, J. E. Uso de fitoterápicos na cura de enfermidades em animais no Semiárido Paraibano. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 7, e261974040, 2020.

SPIEGELHAUER, M. R.; REZA, C.; IVERSEN, A. K. S.; ANDERSEN, L. P. Infection with *Rothia mucilaginosa*: review of findings at a Danish tertiary hospital and reports in literature. **EC Microbiol**, v. 15, n. 11, p. 50-63, 2019.

TEIXEIRA, M. G. F.; LEMOS, T. D.; BOBANY, D. M.; SILVA, M. E. M.; BASTOS, B. F.; MELLO, M. L. V. Diagnóstico citológico de otite externa em cães. **Brazilian Journal of Animal and Environmental Research**, v. 2, n. 5, p. 1693-1701, 2019.

TROPICOS, global plants. **Entry for Spondias mombin Linn. [family ANACARDIACEAE]**, 2013. Disponível em: <[https://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.upwta.1\\_210](https://plants.jstor.org/stable/10.5555/al.ap.upwta.1_210)>. Acesso em: 21 de jun. de 2021.

TOLLS J. Sorption of veterinary pharmaceuticals in soil: a review. **Environ Sci Technol**. v. 35, p. 3397-3406, 2001.

TÔRRES A.R.; OLIVEIRA, R. A. G.; DINIZ, M. F. F. M.; ARAÚJO, E. C. E. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.15, n.4, p.373-380, 2005.

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

TURHANOGLU, M. et al. Avaliação dos resultados obtidos na análise microbiológica de hemoculturas ao longo de 5 anos. **Journal of Family Medicine and Health Care** , v. 2, n. 4, p. 43-50, 2016.

VELÁZQUEZ-GUADARRAMA, N.; OLIVARES-CERVANTES, A. L.; SALINAS, E.; MARTÍNEZ, L.; ESCORCIA, M.; OROPEZA, R.; ROSAS, I. Presence of environmental coagulase-positive staphylococci, their clonal relationship, resistance factors and ability to form biofilm. **Revista Argentina de Microbiología**, v. 49, n. 1, p. 15-23, 2017.

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

ZACHARY, J. F.; MCGAVIN, M. D. **Pathologic Basis of Veterinary Disease-E-Book**. Elsevier Health Sciences, 1249 pag., 2013.

ZENI, A. L. B. et al. Utilização de plantas medicinais como remédio caseiro na Atenção Primária em Blumenau, Santa Catarina, Brasil. **Ciência & Saúde Coletiva**, v. 22, p. 2703-2712, 2017.

ZIMMERMANN, E. S.; Parisotto, A. V.; Mattos, G.; Helena, E. T. S. Modelagem farmacocinética populacional na avaliação do papel da glicoproteína-P na penetração tecidual de fluoroquinolonas. Tese (doutorado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Porto Alegre, BR-RS, 153 f., 2015.

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

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a eficácia antibacteriana da solução otológica à base de folhas de cajá (*Spondias mombin* L.) no tratamento das otites externas bacterianas em cães.

#### 3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar os agentes etiológicos das otites externas bacterianas em cães;
- Avaliar o perfil de sensibilidade antimicrobiana dos microrganismos isolados de otite canina;
- Avaliar a citotoxicidade de *Spondias mombin* L. em células epiteliais canina;
- Avaliar a eficácia antibacteriana *in vivo* da solução otológica a base de *Spondias mombin* L.;
- Avaliar os sinais clínicos das otites com o uso da solução otológica a base de *Spondias mombin* L.

**4. CAPÍTULO 1**

**EFICÁCIA ANTIBACTERIANA *IN VIVO* DA SOLUÇÃO OTOLÓGICA À BASE  
DE *Spondias mombin* L. NO TRATAMENTO DE OTITE EXTERNA EM CÃES**

Brazilian Journal of Veterinary and Animal Science  
Qualis B1

**EFICÁCIA ANTIBACTERIANA *IN VIVO* DA SOLUÇÃO OTOLÓGICA À BASE DE *Spondias mombin* L. NO TRATAMENTO DE OTITE EXTERNA EM CÃES**

***IN VIVO* ANTIBACTERIAL EFFECTIVENESS OF THE OTOLOGICAL SOLUTION BASED ON *Spondias mombin* L. IN THE TREATMENT OF EXTERNAL OTITIS IN DOGS**

Jonas dos Santos Silva<sup>1</sup> - ORCID: 0000-0001-5040-3471; Francisco Marlon Carneiro Feijó<sup>1\*</sup> – ORCID: 0000-0002-7941-8949; Nilza Dutra Alves<sup>1</sup> – ORCID: 0000-0002-2332-9293; Gardênia Silvana de Oliveira Rodrigues<sup>1</sup> – ORCID: 0000-0003-0980-5561; Caio Sérgio Santos<sup>1</sup> – ORCID: 0000-0001-9133-1857; Aleksandra Fernandes Pereira<sup>1</sup> - ORCID: 0000-0003-2137-854; Erinara Valeska da Silva Moreira<sup>1</sup> – ORCID: 0000-0002-0466-4387; Letícia Caetano Siqueira<sup>1</sup> – ORCID: 0000-0001-5826-6459; Leon Denner Moreira Benício<sup>1</sup> – ORCID: 0000-0001-6117-1573; Yara Stephanie Ramos Ribeiro<sup>1</sup> – ORCID: 0000-0001-8732-3870; Matheus Barbosa do Nascimento<sup>1</sup> – ORCID: 0000-0003-2661-0846.

<sup>1</sup>Universidade Federal Rural do Semi-Árido (UFERSA), BR 110 - Km 47, Bairro Presidente Costa e Silva, CEP 59625-900, Mossoró-RN. \*Autor correspondente. E-mail: marlon@ufersa.edu.br

**RESUMO**

Esta pesquisa avaliou a eficácia da solução otológica à base de folhas de cajá (*Spondias mombin* L. - SM) como alternativa terapêutica no tratamento da otite externa bacteriana em cães. Para tanto, 20 cães, sem sexo, raça e idade definida foram divididos em quatro grupos, o primeiro grupo utilizou SM 2% diluído em glicerina e aplicado 24 / 24h, o segundo grupo utilizou SM 2% diluído em glicerina e aplicado 12 / 12h, o terceiro grupo com ciprofloxacina de controle positivo a 3,5% e o quarto grupo com SM a 20% aplicado 12 / 12h. Após 21 dias de tratamento, o antimicrobiano alternativo SM a 2% diluído em glicerina e aplicado por 12 / 12h apresentou redução na unidade formadora de colônia (UFC) sem diferença estatística da ciproflaxacina, sem alterações toxicológicas nos parâmetros de morfologia, viabilidade e atividade das células epiteliais, além de reduzir os sinais clínicos avaliados, comprovando sua eficácia como tratamento para otites em cães.

Palavras-chave: plantas medicinais, antimicrobiano, otite canina, contagem, toxicidade.

**ABSTRACT**

This research evaluated the effectiveness of the otological solution based on cajá leaves (*Spondias mombin* L. - SM) as a therapeutic alternative in the treatment of bacterial external otitis in dogs. For that, 20 dogs, without sex, breed and defined ages were divided into four groups, the first group used 2% SM diluted in glycerin and applied 24/24h, the second group used 2% SM diluted in glycerin and applied 12/12h, the third group as a positive control ciprofloxacin at 3.5% and the fourth group with SM at 20% applied 12/12h. After 21 days of treatment, the alternative antimicrobial SM at 2% diluted in glycerin and applied for 12/12h showed a reduction in the colony forming unit (CFU) with no statistical difference from ciprofloxacin, no toxicological changes on the parameters of morphology, viability and epithelial cell activity, in addition to reducing the clinical signs evaluated, proving its effectiveness as a treatment for otitis in dogs.

Keywords: medicinal plants, antimicrobial, canine otitis, counting, toxicity.

## INTRODUCTION

Brazil has the richest plant biodiversity in the world; it is home to the Caatinga biome that houses numerous plants with medicinal potential. Herbal medicines are recognized for their effectiveness in treating illnesses while having few side effects, low cost, and high acceptability by society. Thus, the use of these products is an alternative to commonly used allopathic medicines while minimizing social, economic, cultural, and environmental problems (Dantas *et al.*, 2020).

*Spondias mombin* L. (SM) is a fruit tree, that reaches heights of 30 m, with trunks around 60–75 cm wide, deciduous leaves around 9–11 cm in size that have 5–11 leaflets, and small white flowers arranged in bunches at the end of the branch. The fruits, called drupes, are yellowish and can be around 2–4 cm long and 1.5–2 cm wide. In northeastern Brazil, it is popularly known as *cajazeira* or *caja* (Leonez *et al.*, 2018). The plant has active principles including flavonoids, flavonols, and condensed tannins that have various benefits such as antimicrobial properties (Abiodun *et al.*, 2020).

Bacterial resistance to allopathic antimicrobials is becoming a pressing issue for medical professionals. Resistance is responsible for increased treatment costs and higher mortality rates due to untreatable infections; it is now a challenge for clinical management (Liu *et al.*, 2018). The use of herbal medicines such as SM, that is already widely used by several communities, may be a suitable alternative to treat diseases caused by multidrug-resistant bacteria.

Otitis is a common veterinary disease; it is characterized by inflammation and infection in the ear caused by microorganisms such as *Pseudomonas aeruginosa*. The number of bacterial strains that are multidrug resistant and that are encountered in the daily routine of veterinary medicine is on the rise due to genes in plasmids (Silva *et al.*, 2016).

This study aimed to evaluate the antimicrobial efficacy of an otological solution made from *caja* leaves for the treatment of bacterial external otitis in dogs, as this is a promising antimicrobial alternative according to Leonez *et al.* (2018) and Dantas *et al.* (2020).

## MATERIALS AND METHODS

The experiment, including the production of the SM decoction and the processing of biological samples, was conducted at the Veterinary Microbiology Laboratory (LAMIV), and the cytotoxicity evaluation was carried out at the Laboratory of Animal Biotechnology (LBA) of the Federal Rural University of the Semi-Arid (UFERSA), Mossoró, RN, Brazil.

The study was approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA), from the UFERSA, number 01/2020, protocol no. 23091.014195/2019-78.

The SM leaves were collected at 7:00 a.m. at Mossoro, RN (coordinates - 5.200276184508256, -37.32056735242512). The plant species was identified in the herbarium Dárdaro of Andrade Lima and catalogued under number 13953. The solution was produced under decoction at a concentration of 20% for 10 min and then diluted to 2% in a glycerin solution. The *in vivo* antibacterial potential of the otological solution was verified in 15 adult dogs with external bacterial otitis, through the quantification of bacteria under the action of SM-based decoction in three groups (5 dogs each), SM 2% diluted in glycerin and applied 24/24 h (SM 2%-GLY24/24h), SM 2% diluted in glycerin and applied 12/12h (SM 2%-GLY12/12h), SM 20% applied 12/12 h (SM 20% 12/12h), and 5 adult dogs used ciprofloxacin (CIPRO 3.5%-12/12h) as a positive control, at days 7, 14, and 21 after initiation of treatment. Treatments consisted of 7 drops (per application) of the corresponding solution instilled into each animal.

Otological secretions were recovered from each dog, homogenized in a tube containing 2 mL of distilled water, and submitted to dilutions of  $10^1$  to  $10^4$ . Dilution samples (1 mL each) were placed in Petri count plates in agar, in duplicates, incubated in a bacteriological incubator (Fanem, Sao Paulo, Brazil) at 37 °C for 24 h, and quantified by the plate counting technique (Tortora *et al.*, 2007). For the identification of bacteria during treatments, otological secretions were placed in Petri dishes containing 5% defibrinated sheep blood and MacConkey agar (Himedia, Mumbai, India) and incubated at 37 °C for 24–48 h; cultures were then subjected to identification as previously described (MacFaddin, 2000).

Clinical signs, including hyperemia, hyperpigmentation, hyperkeratosis, flaking, presence of secretion, pain, and pruritus, were evaluated using a checklist on days 0, 7, 14, and 21; they were assigned scores varying from +1 to +5 to determine the efficacy of the solutions.

To evaluate cytotoxicity, skin fragments (9.0 mm<sup>3</sup>) were cultured *in vitro* in Dulbecco's modified eagle medium (DMEM) supplemented with 10% bovine fetal serum and 2% of an antibiotic-antimycotic solution (10,000 units/mL penicillin, 10,000 units/mL streptomycin, and 25 µg/mL amphotericin, Gibco BRL, Carlsbad, CA, USA) at 38.5 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Epithelial cells cultivated in the 3rd passage were used for toxicity analysis at 80% confluence and at a concentration of  $5.0 \times 10^4$  cells/mL. These cells were then divided into four groups and incubated for 12 h; cell groups were either grown in the absence of the SM decoction (SM 0) or in the presence of 20% SM decoction (SM 20), 2% SM decoction (SM 2), or ciprofloxacin 3.5% (CIPRO 3.5%). After the incubation period, cell morphology was evaluated using an inverted microscope (Nikon TS100, Tokyo, Japan). In addition, cell viability was evaluated using trypan blue (0.4%), where blue-colored cells were considered non-viable and colorless cells were considered viable. Briefly, after trypsinization, cells were incubated with trypan blue and counted in a Neubauer chamber (Kasvi), and the viability rate was calculated according to the formula: (number of living cells / total number of counted cells) × 100. For the evaluation of cell metabolic activity, an assay of 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazolium chloride (MTT) was used. Briefly, the cells were incubated with 5 mg/mL MTT for 3 h. After this period, the MTT solution was removed and 1.0 mL of dimethyl sulfoxide (DMSO) was added. The absorbance of the samples was measured using a spectrophotometer (Shimadzu® UV-mini-1240, Kyoto, Japan) at 595 nm.

Descriptive statistics were performed with the number and percentage of species and bacterial resistance. The results from the quantification of bacteria, cytotoxicity, and clinical signs were submitted to an analysis of variance (ANOVA) and the significance was found between the treatments. In addition, the mean comparison test (Tukey at 5% probability) was applied using the statistical program SISVAR 5.6. For cytotoxicity, the data were expressed as the mean ± standard error of the four repetitions and analyzed using Graphpad software (Graph-Pad Software Incorporated, La Jolla, CA, USA). All results were verified for normality using the Shapiro-Wilk test and for homoscedasticity using the Levene test. Those data that did not present a normal distribution were transformed using arc sine.

## RESULTS AND DISCUSSION

In total, 33 bacterial strains were isolated. the results regarding the etiology of otitis cases, as well as the frequencies of these isolations, are presented in Tab. 1.

Table 1. Number and percentage of microorganisms isolated from dogs with otitis treated with SM decoction at 2% or 20% or with ciprofloxacin at 3.5%.

Microorganisms	No. of isolates	Percentage
<i>Citrobacter freundii</i>	1	4%
<i>Enterococcus</i> spp.	1	4%
<i>Pantoea agglomerans</i>	1	4%
<i>Stomatococcus</i> spp.	1	4%
<i>Proteus</i> spp.	2	6.1%
<i>Enterobacter</i> spp.	3	9.1%
<i>Streptococcus</i> spp.	8	24.3%
<i>Staphylococcus</i> spp.	16	44.5%

*Staphylococcus* spp. had the highest incidence because they are common members of the ear canal microbiome; however, they may behave as opportunistic bacteria under certain host conditions (Mariotini and Carvalho, 2020). Thus, a therapy with MS, which presents tannins, can be an alternative form of treatment for these bacteria, promoting binding with metal ions and forming a protective epithelial biofilm (Abiodun *et al.*, 2020).

*Streptococcus* spp. are also considered as causative agents of otitis; they play a role as pathogens and favor the development of infections. Bioactive compounds present in SM such as flavonoids (Souza *et al.*, 2020) may act as inhibitors of these microorganisms, representing the possibility of combating antimicrobial-resistant bacteria commonly found in veterinary medicine.

Identified enterobacterial strains (*Pantoea agglomerans*, *Proteus* spp., *Enterobacter* spp., *Citrobacter freundii*, *Enterococcus* spp., and *Stomatococcus* spp.) may have been acquired from the environment (from raw food, soil, water sources, plants, or wastewater), other animals (from saliva, urine, and feces), or humans (Armbruster *et al.*, 2018; Liu *et al.*, 2018; Dutra *et al.*, 2021). These bacteria commonly cause infections in animals and exhibit antimicrobial resistance (mainly to penicillin and aminoglycosides), which is a problem in veterinary clinics . Thus, bioactive compounds such as catechins, flavanones, xanthenes, and steroids present in SM leaves may be used for the production of potential drugs against these microorganisms (Abiodun *et al.*, 2020).

Among the 33 bacterial strains, 32 (97%) showed resistance to at least one antimicrobial and 9 (27%) were resistant to three or more different antimicrobials, according to results analyzed in the table of diameters of halos of the Brazilian Committee for Testing of

Antimicrobial Susceptibility (BrCAST), as described in Table 2. From these, 32 (97%) strains showed resistance to amoxicillin + clavulanic acid (AMC) and ceftazidime (CAZ), followed by 30 (91%) strains showing resistance to ampicillin (AMP), cefepime (CPM), and aztreonam (ATM). The lowest index was for the antimicrobial ciprofloxacin (CIP) to which only 9 (27%) bacterial strains showed resistance. Resistance to clavulanic acid + amoxicillin probably occurred due to genetic factors such as the presence of cassettes in DNA (SCCmec) in bacteria such as *Staphylococcus* spp. (Wegener *et al.*, 2020).

These results showed similarity with reports on the emergence of multidrug-resistant bacteria (Velázquez-Guadarrama *et al.*, 2017) and are probably influenced by the lack of regulation of broad-spectrum antimicrobials in veterinary clinics, which further adds pressure on the selection of skin's bacteria.

Table 2. Number and percentage of antimicrobial resistances among bacteria isolated from dogs with otitis treated with SM decoction at 2% or 20% or with ciprofloxacin at 3.5%.

Antimicrobials	No. of resistant strains	% of resistant strains
Ciprofloxacin (CIP)	9	27%
Chloramphenicol (CLO)	11	33%
Ceftriaxone (CRO)	12	36%
Amikacin (AMI)	13	39%
Cephalothin (CFL)	13	39%
Gentamicin (GEN)	13	39%
Sulfamethoxazole + Trimethoprim (SUT)	13	39%
Cefoxitin (CFO)	16	48%
Tetracycline (TET)	18	55%
Piperacillin + Tazobactam (PIT)	23	70%
Ampicillin (AMP)	30	91%
Aztreonam (ATM)	30	91%
Cefepime (CPM)	30	91%
Amoxicillin + Clavulanic Acid (AMC)	32	97%
Ceftazidime (CAZ)	32	97%

The genera of the isolated bacteria and their antimicrobial resistance profiles are described in Table 3. Six multidrug-resistant genres were identified in the present study: *Citrobacter freundii*, *Enterobacter* spp., *Proteus* spp., *Staphylococcus* spp., *Stomatococcus* spp., and *Streptococcus* spp. Magiorakos *et al.* (2012) stated that a microorganism is considered multi-resistant when it is resistant to three distinct classes of antimicrobials simultaneously due to factors associated with plasmids. *Staphylococcus* spp. may have strong epithelial extracellular structures, form biofilms, and present *mecA*-associated resistance, all of which hinder the antimicrobial activity of drugs, especially of  $\beta$ -lactam drugs (penicillin, cephalosporins, carbapenems, and monobactams), causing persistent infections (Sonesson *et*

*al.*, 2017). In a study by Davis *et al.* (2014), from the 11 samples of the genus *Staphylococcus* spp. obtained from dogs, 10 had the same resistance profile, being resistant to eight different antimicrobials, including ampicillin and ciprofloxacin.

Table 3. Genera of bacteria isolated and their antimicrobial resistance profiles.

Bacteria	Resistance profile
<i>Citrobacter freundii</i>	AMC, CIP, GEN, AMP, CPM, CRO, CFO, PIT, ATM, CAZ
<i>Enterobacter</i> spp.	AMC, SUT, CIP, CFL, GEN, AMP, AMI, CPM, TET, CRO, CFO, PIT, ATM, CLO, CAZ
<i>Enterococcus</i> spp.	AMC, AMP, CPM, ATM, CAZ
<i>Pantoea agglomerans</i>	AMC, CFL, AMP, CPM, CRO, CFO, PIT, CLO, CAZ
<i>Proteus</i> spp.	AMC, SUT, CFL, GEN, AMP, AMI, CPM, TET, CRO, CFO, PIT, ATM, CLO, CAZ
<i>Staphylococcus</i> spp.	SUT, CIP, CRO, CFL, AMI, GEN, TET, CFO, PIT, CPM, AMP, ATM, CLO, CAZ
<i>Stomatococcus</i> spp.	AMC, SUT, CIP, CFL, GEN, AMP, AMI, CPM, TET, CRO, CFO, PIT, ATM, CLO, CAZ
<i>Streptococcus</i> spp.	AMC, SUT, CIP, CFL, GEN, AMP, AMI, CPM, TET, CRO, CFO, PIT, ATM, CLO, CAZ

The resistances of the *Citrobacter freundii* strain may indicate the presence of Amp-C  $\beta$ -lactamase (Amp-C), broad-spectrum  $\beta$ -lactamase, and extended-spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL) enzymes (Liu *et al.*, 2018). *Enterococcus* spp. strains may be resistant to  $\beta$ -lactams through the PBP4 and PBP5 genes, to aminoglycosides due to the change in the transport of the drug into the microbial cell, and to glycopeptides due to the presence of operons modifying the antimicrobial binding site (Miranda *et al.*, 2017). Strains of *Streptococcus* spp. may have PBPs (1a, 1b, 2a, 2b, 2x, and 3) that alter the affinity of binding to antimicrobials (Bessa and Laranjeira, 2021); they are mainly acquired by DNA transfer (by transformation). The ability to modulate the mechanisms of resistance to  $\beta$ -lactams, such as the cephalosporinase of the type  $\beta$ -lactamase AmpC and  $\beta$ -lactamases TEM-24, SHV, or CTX-M (Davin-Regli *et al.*, 2019), may be present in strains of *Enterobacter* spp. *Proteus* spp. are usually resistant to  $\beta$ -lactams due to their capacity of producing metallo- $\beta$ -lactamases and carbapenemases, mediated mainly by genetic elements in plasmids (Martins *et al.*, 2019).

Thus, the use of an herbal medicine with MS can be indicated as a therapeutic alternative containing active ingredients that act significantly in the inhibition of these microorganisms, as verified by Leonez *et al.* (2018). Also observing the efficacy of SM decoction in inhibiting strains of *Staphylococcus* coagulase-negative as well as in healing surgical wounds of procedures such as salpingo-oophorectomy and orchiectomy (Dantas *et al.*, 2020).

The results of the microbial counts of the different groups at 0, 7, 14, and 21 days are shown in Fig. 1. There was a relation between the total number of colony-forming units (CFUs) and the number of days of treatment. A linear behavior was verified for treatments in the SM 2%-GLY24/24h and SM 2%-GLY12/12h groups; such similar behaviors showed a tendency to reduce the number of CFUs over the days of application. The means were adjusted to a quadratic model.

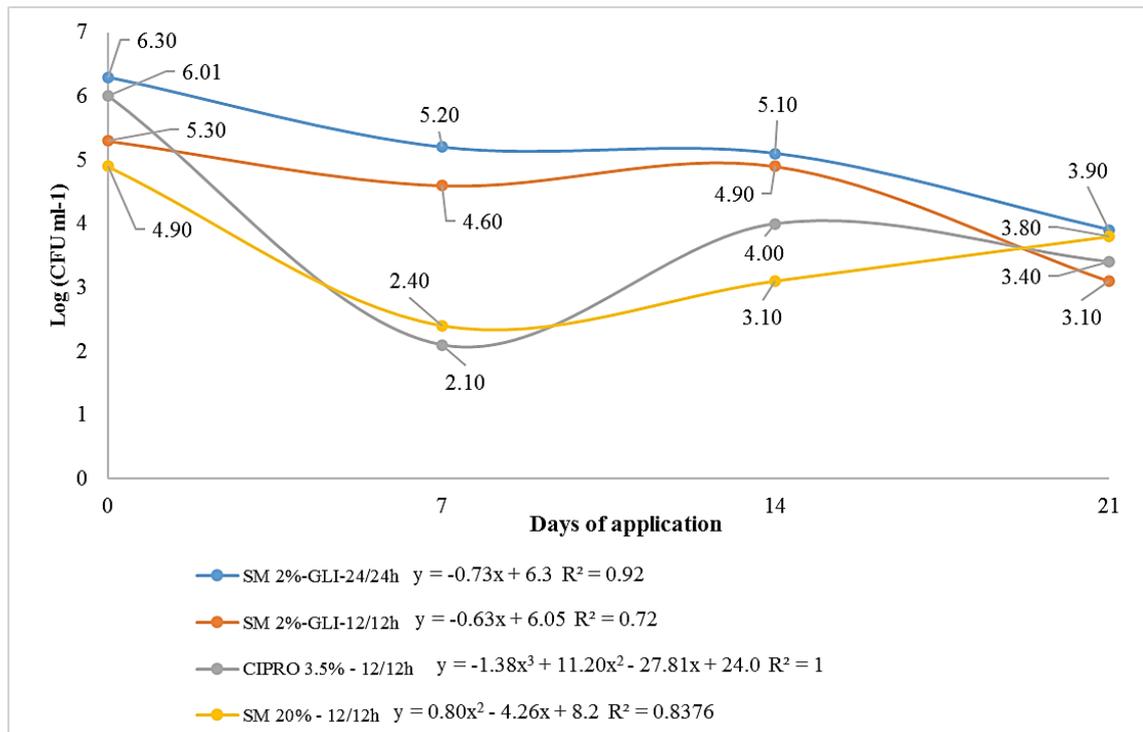


Figure 1. Average microbial count (log CFU.ml<sup>-1</sup>) in samples from the auricular pavilion of dogs with otitis treated with *Spondias mombin* L. (SM) decoction and ciprofloxacin (CIPRO) at days 0, 7, 14, and 21.

There was a general decrease in CFUs after 7 days of application of all treatments, with averages for SM 2%-GLY24/24h, SM 2%-GLY12/12h, SM 20% 12/12h, and CIPRO 3.5% 12/12h groups at 5.20, 4.60, 2.10, and 2.40 log CFU.ml<sup>-1</sup>, respectively. At 14 days, the number of bacteria recovered after treatment with decoction SM 20% 12/12h (3.10) was smaller than that for the CIPRO group (4.00) ( $p < 0.05$ ), and those for the SM 2%-GLY12/12h (4.60) and the CIPRO (4.00) groups were similar. Although the mean number of bacteria recovered from the SM 2%-GLY24/24h group (5.40) was the highest, there was no statistically significant difference between this and the CIPRO group. The increase in the number of bacteria at 14 days, compared to that in day 7, may be due to antimicrobial resistance of gram-negative bacteria, as described by Liu *et al.* (2018). At 21 days, the used of all alternative antimicrobials gave similar results, with no statistically significant differences compared to CIPRO. The

decrease in the number of bacteria in these groups over time probably occurred because of the presence of glycerin. This compound probably allowed greater permanence of SM ingredients (Baumi *et al.*, 2017), and supported a gradual and prolonged performance of active principles, such as geranine and galoylgeranine bioactives, two different ellagitannins, chlorogenic acid, 2-caffeoyl acid, salicylic acid, triterpene 3 $\beta$ -urs-12-en-3-yl(9z)-hexadec-9-enoate (Cangussu *et al.*, 2020), and gaelic tannins, that have medicinal properties that kill gram-positive bacteria (Leonez *et al.*, 2018).

*In vitro* cytotoxicological analyses showed no signs of toxicological changes in morphology after treating cells with SM decoction at concentrations of 2% (SM 2% GLY) and 20% (SM 20%) (Fig. 2). Additionally, viability parameters were similar among cells treated with SM decoction (either SM 2% GLY or SM 20%), a ciprofloxacin solution at 3.5% (CIPRO 3.5), or distilled water (control group, CTR 0) (Table 4).

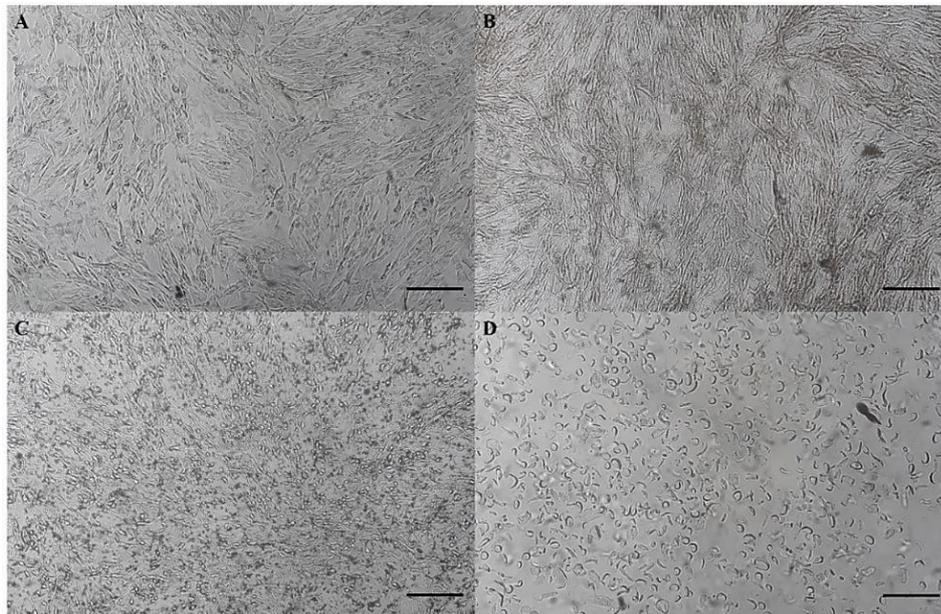


Figure 2. Morphological evaluation of epithelial cells exposed to 20% SM decoction 2% SM decoction, and ciprofloxacin 3.5%. A) Negative control, B) 20% SM decoction, C) 2% SM decoction, D) ciprofloxacin 3.5%. Scale bar = 100  $\mu$ m; 100 $\times$  magnification.

Table 4. Viability of epithelial cells grown *in vitro* with SM decoction at different concentrations (2% and 20%) and ciprofloxacin 3.5%.

Groups	Cell viability (%)	P compared to the control
CTR 0	67.3 $\pm$ 11.4 <sup>a</sup>	--
SM 20	62.0 $\pm$ 5.7 <sup>a</sup>	0.8553
SM 2	77.8 $\pm$ 9.1 <sup>a</sup>	0.4322
CIPRO 3.5	76.1 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	0.5973

Values are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (SD) CTR 0: Negative control; SM 2: *Spondias mombin* 2% extract; SM 20: *Spondias mombin* 20% extract; CIPRO 3.5: Ciprofloxacin 3.5%.

There was no difference in the percentage of metabolic activity (Table 5) between the cells cultivated in the presence of SM decoction at both concentrations tested (20% and 2%). However, the percentage of metabolic activity of cells grown in the presence of CIPRO at 3.5% differed from that of the negative control ( $p < 0.05$ ). These results confirm the utility of *Spondias mombin* L. decoction in the treatment of diseases such as otitis, as observed by Silva *et al.* (2016). Noteworthy, no biochemical, hematological, or behavioral changes were observed in rats treated with up to 2000 mg/kg of *Spondias mombin* × *Spondias tuberosa* decoction. The results *in vitro* are promising regarding plant cytotoxicity; they confirm the results of Abiodun *et al.* (2020), who reported that SM decoction does not promote cellular toxicity because it contains phenolic compounds (such as capsaicin and dihydrocapsaicin). Moreover, SM decoction may have cellular antioxidant capacity due to the presence of flavonoids (Souza *et al.*, 2020). The results from the CIPRO group can be justified according to Guimarães *et al.* (2010), who confirmed that these drugs inhibit cellular topoisomerases of bacteria such as *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella* spp., and *Staphylococcus aureus*; however, serious side effects were described in nerve cells by Tomé and Filipe (2011).

Table 5. Metabolic activity of epithelial cells grown *in vitro* with SM decoction at different concentrations (20% and 2%) and ciprofloxacin at 3.5%.

Groups	Metabolic activity (%)	P compared to the control
CTR 0	100.0 ± 1.5 <sup>a</sup>	--
SM 20	100.0 ± 4.7 <sup>a</sup>	0.9993
SM 2	94.1 ± 4.9 <sup>a</sup>	0.1112
CIPRO 3.5	6.8 ± 1.8 <sup>b</sup>	0.0001

Values are expressed as mean ± standard deviation (SD). <sup>a,b</sup>: Different superscript letters indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ). CTR 0: Negative control; SM 2: *Spondias mombin* 2% decoction; SM 20: *Spondias mombin* 20% decoction; CIPRO 3.5: Ciprofloxacin 3.5%.

The results of the macroscopic analysis of the clinical signs of otitis during the 21 days of treatment are described in Fig 3. The scores for pruritus, pain, hyperpigmentation, flaking, erythema, and exudate in the SM 2%-GLY12/12h and SM 20% 12/12h groups are similar to those of the positive control CIPRO group ( $p < 0.05$ ). Described clinical signs are general responses to the action of macrophages and leukocytes, auxiliaries in the production of IL-1, IL-6, and TNF- $\alpha$  (Del Giudice and Gangestad, 2018). Most probably, these signs were inhibited by the anti-inflammatory action of the phenolic compounds, such as ellagic and chlorogenic acids, present in SM (Cabral *et al.*, 2016).

The increased scores of pruritus and exudate for the SM 2%-GLY24/24h group in relation to the other treatment groups ( $p < 0.05$ ) may have resulted from the virulence factors of the

microorganisms present, for example, leukocidin, deoxyribonuclease, and hyaluronidase from *Staphylococcus* spp.; adhesins, the *mrp* operon, importers and exporters of ions, and integrative and conjugative elements called ICE Pm1 from *Proteus* spp. (Armbruster *et al.*, 2018); the transcriptional regulation factor Cra from *Citrobacter freundii*; the gelatinase (GelE), aggregation factor (Agg), hyaluronidase, and cytolysin (Cyl,  $\beta$ -hemolysin) from *Enterococcus* spp.; and biofilm formation by *Stomatococcus* spp. (Cussolim *et al.*, 2021; Popović *et al.*, 2018; Bowen *et al.*, 2017).

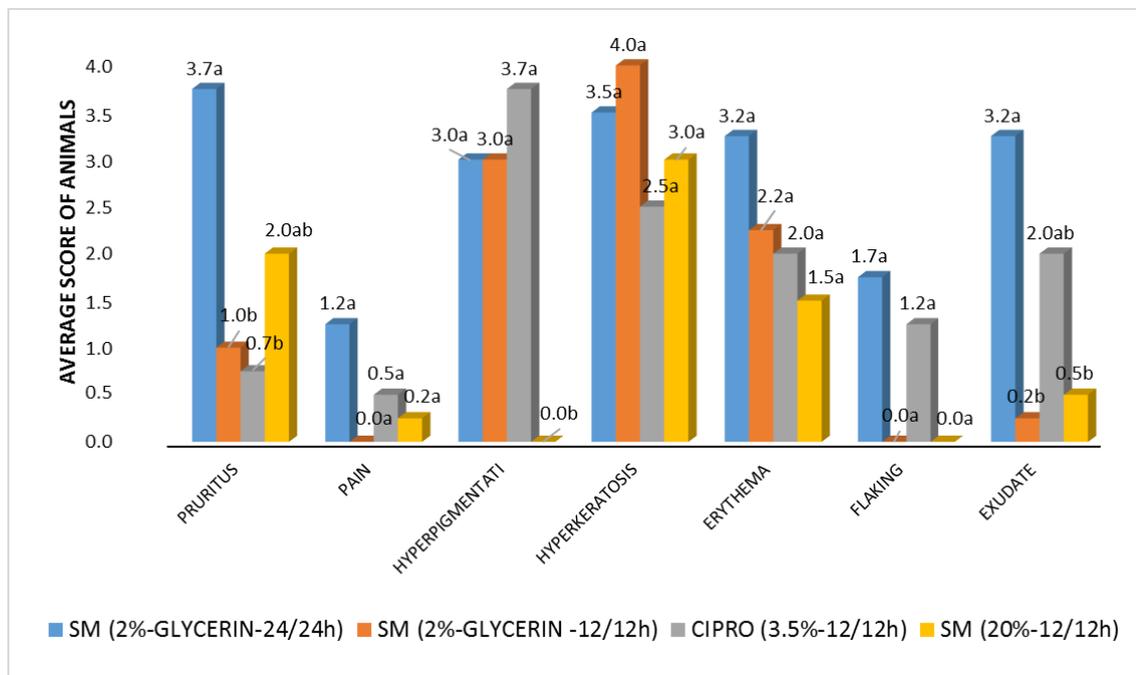


Figure 3. Mean scores for clinical signs observed in dogs treated with *Spondias mombin* L. decoction and ciprofloxacin for 21 days. <sup>a,b</sup>: Different letters (next to the mean values) indicate statistically significant differences ( $p < 0.05$ ).

## CONCLUSION

The otological solution of *Spondias mombin* L. 2%, diluted in glycerin and applied every 12 h to dogs with otitis, showed the best potential as an alternative herbal therapy due to its association with decreased bacterial counts and the improvement of scores for the clinical signs evaluated as well as for the absence of epithelial cell toxicity.

## ACKNOWLEDGMENTS

CAPES for the assistance with scholarship promotion for completion of the master's degree.

## REFERENCES

ABIODUN, O. O.; NNORUKA, M. E.; TIJANI, R. O. Phytochemical Constituents, Antioxidant Activity, and Toxicity Assessment of the Seed of *Spondias mombin* L. (Anacardiaceae). **Turkish Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol. 17, n. 3, p. 343, 2020.

ARMBRUSTER, C. E.; MOBLEY, H. L. T.; PEARSON, M. M. Patogênese da infecção por *Proteus mirabilis*. **EcoSal Plus**, v. 8, n. 1, 2018.

BAUMI, J.; BERTOSSE, C. M.; CARVALHO, G. M. *et al.* Utilização de Glicerina da Produção de Biodiesel na Reciclagem de Retraço Têxtil. **Revista Virtual de Química**, v. 9, n. 4, 2017.

BESSA, V. C.; LARANJEIRA, B. J. Mecanismos de Resistência Bacteriana em Cocos Gram Positivos. **Revista Científica UNIFAGOC-Saúde**, v. 5, p. 40-48, 2021.

BOWEN, W. H.; BURNE, R. A.; WU, H. *et al.* Oral Bio films: Pathogens, Matrix, and Polymicrobial Interactions in Microenvironments. **Trends in Microbiology**, v. 26, p. 1–14, 2017.

CABRAL, B.; SIQUEIRA, E. M. S.; BITENCOURT, M. A. O. *et al.* Phytochemical study and anti-inflammatory and antioxidant potential of *Spondias mombin* leaves. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p. 304-311, 2016.

CANGUSSU, L. B.; FRONZA, P.; CAVALCANTI, W. M. Fiber-rich powders of tropical fruits by-products: a bibliographic review on their bioactive compounds. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e80996803-e80996803, 2020.

CUSSOLIM, P. A.; JUNIOR, A. S.; MELO, A. L. *et al.* Mecanismos de resistência do *staphylococcus aureus* a antibióticos. **Revista Faculdades do Saber**, v. 6, n. 12, p. 831-843, 2021.

DANTAS, T. D. P. D., FEIJÓ, F. M. C., ALVES, N. D. *et al.* *Spondias mombin* L. decoction utilization as antiseptic in cats submitted to castration. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 57, n. 2, 2020.

DAVIN-REGLI, A.; LAVIGNE, J. P.; PAGÈS, J. M. *Enterobacter* spp.: Update on Taxonomy, Clinical Aspects, and Emerging Antimicrobial Resistance. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 32, n. 4, 2019.

DAVIS, J. A.; JACKSON, C. R.; FEDORKA-CRAY, P. J. *et al.* Carriage of methicillin-resistant staphylococci by healthy companion animals in the US. **Letters in applied microbiology**, v. 59, n. 1, p. 1-8, 2014.

DEL GIUDICE, M.; GANGESTAD, S. W. Repensando IL-6 e CRP: Por que eles são mais do que biomarcadores inflamatórios e por que isso é importante. **Cérebro, comportamento e imunidade**, vol. 70, p. 61-75, 2018.

DUTRA, V. G. L.; BRANDÃO, M. J. P.; SOUZA, L. S. S. *et al.* Perfil de virulência e resistência à antibióticos de amostras de *enterococcus* sp. isolados de amostras clínicas e ambientais da comunidade do lago do limão no município de Iranduba-AM. **Revista Brasileira de Desenvolvimento**, v. 7, n. 5, p. 52646-52659, 2021.

GUIMARÃES, D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.

LEONEZ, C. F.; FEIJÓ, F. M. C.; ALVES, N. D. *et al.* Efficacy of the decoction of cashew leaf (*Spondias mombin* L.) as a natural antiseptic in dairy goat matrices. *African Journal of Agricultural Research*, v. 13, n. 13, p. 644-649, 2018.

LIU, L.; WANG, N.; WU, A. Y. *et al.* Bacteremia por *Citrobacter freundii*: Fatores de risco de mortalidade e prevalência de genes de resistência. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 51, n. 4, p. 565-572, 2018.

MACFADDIN, J. F. Biochemical tests for identification of medical bacteria. Lippincott, **Williams & Wilkins**, Baltimore, 850p., 2000.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B. *et al.* Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. **Clinical microbiology and infection**, v. 18, n. 3, p. 268-281, 2012.

MARIOTINI, A. B.; CARVALHO, E. V. Perfil de resistência aos antibióticos de bactérias isoladas de infecções de animais atendidos no UNIFAA. **Revista Saber Digital**, v. 13, n. 1, p. 176-187, 2020.

MARTINS, A.; SILVA, R. A.; FERREIRA, L. O. *et al.* Resistência a antimicrobianos de enterobactérias isoladas de águas destinadas ao abastecimento público na região centro-oeste do estado de São Paulo, Brasil. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**. v. 10, p. 8, 2019.

MIRANDA, M. M.; SIMÕES, A. C. A.; TEIXEIRA, C. D. Resistência a antimicrobianos em cepas de *Enterococcus* spp. Isoladas da UTI de um hospital de Cachoeiro de Itapemirim-ES. **Revista Univap**, v. 22, n. 40, p. 364, 2017.

POPOVIĆ, N.; DINIĆ, M.; TOLINACKI, M. *et al.* Uma nova visão sobre a capacidade de formação de biofilme, a presença de genes de virulência e potencial probiótico de *Enterococcus* sp. isolados de laticínios. *Fronteiras em microbiologia*, v. 9, p. 78, 2018.

SILVA, T. M.; MILBRADT, L. L.; ZAMAE, J. C. *et al.* Transferência de resistência antimicrobiana entre enterobactérias patogênicas de importância aviária-Impactos em saúde pública. **Archives of Veterinary Science**, v. 21, n. 2, p. 9-20, 2016

SONESSON, A.; PRZYBYSZEWSKA, K.; ERIKSSON, S. *et al.* Identification of bacterial biofilm and the *Staphylococcus aureus* derived protease, staphopain, on the skin surface of patients with atopic dermatitis. **Scientific reports**, v. 7, n. 1, p. 1-12, 2017.

SOUZA, V. R.; LIMA, T. P. B.; BRUM, M. C. M. *et al.* Avaliação da ação dos extratos das frutas amazônicas murici (*Byrsonima crassifolia*) e taperebá (*Spondia mombin*) sobre a viabilidade celular em células de câncer de ovário parental e resistente à cisplatina, **Editora Atena**, p. 388–416, 2020.

TOMÉ, A. M.; FILIPE, A. Quinolones. **Drug safety**, v. 34, n. 6, p. 465-488, 2011.

TORTORA, G. J.; FUNKE, B. R.; CASE, C. L. **Introducción a la microbiología**. 9.ed. Ed. Médica Panamericana, 988 p., 2007.

VELÁZQUEZ-GUADARRAMA, N.; OLIVARES-CERVANTES, SALINAS, E. *et al.* Presence of environmental coagulase-positive staphylococci, their clonal relationship, resistance factors and ability to form biofilm. **Revista Argentina de microbiologia**, v. 49, n. 1, p. 15-23, 2017.

WEGENER, A.; DAMBORG, P.; GUARDABASSI, L. *et al.* Specific staphylococcal cassette chromosome *mec* (SCC*mec*) types and clonal complexes are associated with low-level

amoxicillin/clavulanic acid and cefalotin resistance in methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*, *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 75, n. 3, P. 508–511, 2020.

## 5. CONCLUSÃO

Diante do exposto conclui-se que a *Spondias mombin* L. apresenta eficácia antimicrobiana nos testes feitos *in vivo* em otites canina, não apresentando risco citotóxico para os animais, mostrando-se como um potencial medicamento terapêutico alternativo a antimicrobianos industrializados que são utilizados na medicina veterinária.

No que tange as bactérias isoladas e identificadas das otites dos cães, encontrou-se cepas bacterianas do gênero *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Stomatococcus* spp., *Proteus* spp., *Enterococcus* spp. e *Enterobacter* spp, como também as espécies *Citrobacter freundii* e *Pantoea agglomerans*.

A atividade antimicrobiana apresentada pelo decocto da *Spondias mombin* L. demonstrou eficácia terapêutica semelhante ao controle positivo (ciprofloxacina), com o uso da *Spondias mombin* L. a 2% diluído em glicerina e aplicado de 12/12 horas apresentando resultados mais expressivos em comparação aos tratamentos testes analisados durante os 21 dias, por inibir satisfatoriamente todos os microrganismos gram-positivos testados expressando estatisticamente tendência de decréscimo no número de UFC/ml após o período de tratamento analisado, como também diminuir significativamente os índices dos escores referentes aos sinais clínicos de prurido, dor, hiperpigmentação, hiperqueratose, descamação, exsudato e eritema, ocasionados pela otite.

## APÊNDICES

### APÊNDICE 1 - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

##### Esclarecimentos

Este é um convite para você participar da pesquisa “Eficiência antibacteriana da solução otológica à base de folhas de cajá (*spondias mombin L.*) no tratamento das otites externas bacterianas em cães”, que é coordenada pelo Prof. Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó e que segue as recomendações da Lei 11.794 de 04/10/2008 do Conselho Federal de Medicina Veterinária. A participação do seu animal é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade. Essa pesquisa busca identificar os agentes etiológicos das otites externas bacterianas em cães; avaliar o perfil de sensibilidade dos microrganismos isolados das otites; como também a eficácia da solução otológica a base de cajá em comparação a uma solução de uso comercial sobre a carga bacteriana e aspectos clínicos das otites.

Caso decida aceitar o convite, você será submetido(a) ao(s) seguinte(s) procedimentos: assinar esse termo de consentimento autorizando a participação e submissão de seu animal de estimação a uma avaliação clínica de superfícies otológicas, bem como medicamentosa a base de cajá (*Spondia mombin*). Será apresentado o projeto para você com os objetivos, justificativa, benefícios e riscos, e ainda será informado que os mesmos não serão identificados na pesquisa e somente após a aceitação dos mesmos; a pesquisa será realizada. Os riscos envolvidos com a participação de seu animal são: desconforto e distribuição uni ou bilateral da patologia. Você terá os seguintes benefícios ao participar da pesquisa: contribuirá para a avaliação da eficiência antibacteriana obtida a partir da *Spondias mombin L.* proporcionando um antimicrobiano alternativo natural, que vai diminuir a resistência dos microrganismos e os agravos provocados à saúde animal pelas otites; além de ser uma alternativa de melhor custo benefício para a população. Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados no LAMIV/UFERSA<sup>1</sup> sob a responsabilidade do Prof. Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários. Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se seu animal sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito a indenização. Você ficará com uma via (devidamente datada e assinada pelo pesquisador responsável) deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para Prof. Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó, no endereço: Av. Francisco Mota, 572, Costa e Silva, Mossoró-RN ou pelo telefone (84) 3317-8603 ou (84) 98864 1017.

Dúvidas a respeito da ética dessa pesquisa poderão ser questionadas ao Comitê de Ética em Pesquisa da UERN no endereço Avenida Professor Antônio Campos, s/nº, BR 110, km 48 - Campus Central – UERN, Bairro Presidente Costa e Silva, CEP 59.610-090, Mossoró/RN, ou pelo telefone (84) 3312-7032.

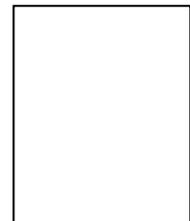
##### Consentimento Livre e Esclarecido

Estou de acordo com a participação no estudo descrito acima. Fui devidamente esclarecido quanto aos objetivos da pesquisa, aos procedimentos aos quais meu animal será submetido e dos possíveis riscos que possam advir de tal participação. Foram-me garantidos esclarecimentos os quais eu venha a solicitar durante o curso da pesquisa e o direito de desistir da participação em qualquer momento, sem que minha desistência implique em qualquer prejuízo a minha pessoa, minha família ou meu animal. A minha participação na pesquisa não implicará em custos ou prejuízos adicionais, sejam esses custos ou prejuízos de caráter econômico, social, psicológico ou moral. Autorizo assim a publicação dos dados da pesquisa a qual me garante o anonimato e o sigilo dos dados referentes à minha identificação.

Local: \_\_\_\_\_ . Data de aplicação: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Participante da pesquisa ou responsável legal

\_\_\_\_\_  
Assinatura do Prof. Dr. Francisco Marlon Carneiro Feijó



Impressão datiloscópica

<sup>1</sup> R. Francisco Mota, 572 - Pres. Costa e Silva, Campus Oeste, Mossoró - RN, 59625-900 - contato (84)3317-8603

## APÊNDICE 2 – FICHA DERMATOLÓGICA

### FICHA DERMATOLÓGICA

Data:		Nome do Tutor:	
End:			
Tel:			
Nome do Animal:		Gênero:	
Idade:	Peso(Kg):	M: <input type="checkbox"/>	Inteiro: <input type="checkbox"/>
Raça:		F: <input type="checkbox"/>	Estéril: <input type="checkbox"/>
Orelhas eretas:		Orelhas Pendulares:	
O.D.: <input type="checkbox"/>	O.E.: <input type="checkbox"/>	O.D.: <input type="checkbox"/>	O.E.: <input type="checkbox"/>

#### Histórico Otológico:

##### 1. Tempo de acometimento?

- Uma semana ou menos;  
 Mais de uma semana;  
 Desconhece;

2. Já houve episódio (s) de Otite no passado? Sim.  Não.

3. Foi feito algum tratamento ou limpeza antes da consulta? Sim.  Não.

Se sim, qual o produto? Durante quanto tempo?:

---



---

4. Atualmente O paciente apresenta prurido? Se sim, qual a intensidade? Sim.  Não.

- Bastante discreto (mais intenso do que antes de ter iniciado o problema dermatológico);  
 Discreto (não se coça quando está dormindo, comendo ou brincando);  
 Moderado (Pode ocorre à noite, não interrompe quando comendo/brincando);  
 Intenso com episódios prolongados (ocorre à noite, interrompe quando comendo/brincando);  
 Intenso e Contínuo (não cessa, independente do que esteja acontecendo ao redor);

#### Exame Otológico (visual):

- |  |                        |
|--|------------------------|
| 1. Dor? <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> Não.              | Escala numérica: _____ |
| 2. Hiperpigmentação? <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> Não. | Escala numérica: _____ |
| 3. Hiperqueratose? <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> Não.   | Escala numérica: _____ |
| 4. Eritema? <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> Não.          | Escala numérica: _____ |
| 5. Excesso de Pêlos? <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> Não. | Escala numérica: _____ |
| 6. Descamação? <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> Não.       | Escala numérica: _____ |
| 7. Exudato? <input type="checkbox"/> Sim. <input type="checkbox"/> Não.          | Escala numérica: _____ |

Se sim, qual a composição?  Pús  Cerúmen  Sangue Outro: \_\_\_\_\_

## ANEXOS

## ANEXO 1 – COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA)



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO SEMI-ÁRIDO COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS**

*Mossoró, 20 de janeiro de 2020.*

**PARECER 01/2020**

*Certificamos que o projeto intitulado “EFICIÊNCIA ANTIBACTERIANA DA SOLUÇÃO OTOLÓGICA À BASE DE FOLHAS DE CAJÁ (SPONDIAS MOMBIN L.) NO TRATAMENTO DAS OTITES EXTERNAS EM CÃES”, protocolo n. 23091.014195/2019-78 sob a responsabilidade de Francisco Marlon Carneiro Feijó – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata , subfilo vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da lei 11794 de 8 de outubro de 2009 e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal Rural do Semi-Árido – UFERSA mediante resposta satisfatória ao memorando 10/2019.*

Vigência do projeto	Outubro de 2019 a junho de 2020
Espécie/linhagem	Canis familiaris
N. de Animais	30
Peso/idade	Adultos, 0,5 a 15 kg
Sexo	Machos e fêmeas
Origem	Tutores

*Emanuelle Dabulo*

**Presidente CEUA-UFERSA**

## ANEXO 2 – SISTEMA DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO (SIGEN)



Ministério do Meio Ambiente  
**CONSELHO DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO DO PATRIMÔNIO GENÉTICO E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL ASSOCIADO

**Comprovante de Cadastro de Acesso**

**Cadastro nº AF6F9C3**

A atividade de acesso ao Patrimônio Genético/CTA, nos termos abaixo resumida, foi cadastrada no SisGen, em atendimento ao previsto na Lei nº 13.123/2015 e seus regulamentos.

Número do cadastro: **AF6F9C3**  
 Usuário: **Francisco marlon Carneiro Feijó**  
 CPF/CNPJ: **416.885.973-87**  
 Objeto do Acesso: **Patrimônio Genético/CTA**  
 Finalidade do Acesso:

Pesquisa Científica       Bioprospecção       Desenvolvimento Tecnológico

**Espécie**

**Staphylococcus aureus**  
**Spondia mombim**

**Fonte do CTA**

**CTA de origem não identificável**

Título da Atividade: **Potencial antimicrobiano de plantas do semiárido sobre patógenos de Interesse médico veterinário e zootecnico**

**Equipe**

**Francisco marlon Carneiro Feijó**      **universidade federal rural do semi-árido**

**Resultados Obtidos**

**Outros resultados**

Data do Cadastro: **01/09/2020 17:04:19**  
 Situação do Cadastro: **Concluído**

Conselho de Gestão do Patrimônio Genético  
 Situação cadastral conforme consulta ao SisGen em **10:58** de **08/09/2020**.



SISTEMA NACIONAL DE GESTÃO  
 DO PATRIMÔNIO GENÉTICO  
 E DO CONHECIMENTO TRADICIONAL  
 ASSOCIADO - **S I G E N**