

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE
Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação
Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal



Dissertação

**Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) frente a
microrganismos isolados de casos de otite externa em cães**

Juliana Grandi

Concórdia, 2018

Juliana Grandi

**Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) frente a
microorganismos isolados de casos de otite externa em cães**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal do Instituto Federal Catarinense, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (área de concentração: Produção e Sanidade Animal).

Orientador: Eduardo Negri Mueller

Coorientador (es): Ana Carolina Gonçalves dos Reis

Marcella Zampoli Troncarelli

Rosema Santin

Concórdia, 2018

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática do ICMC/USP, cedido ao IFC e
adaptado pela CTI - Araquari e pelas bibliotecas do Campus de Araquari e Concórdia.

G753a Grandi, Juliana
Atividade antimicrobiana in vitro de extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) frente a microrganismos isolados de casos de otite externa em cães / Juliana Grandi; orientador Eduardo Negri Mueller; coorientadora Rosema Santin; coorientadora Marcella Zampoli Troncarelli; coorientadora Ana Carolina Gonçalves dos Reis. -- Concórdia, 2018.
34 f.

Dissertação (mestrado) - Instituto Federal Catarinense, campus Concórdia, Programa de Pós-graduação em Produção e Sanidade Animal, Concórdia, 2018.

1. Otopatia. 2. Planta. 3. Resistência microbiana. 4. *Staphylococcus coagulase positiva*. 5. *Malassezia pachydermatis*. I. Mueller, Eduardo Negri, II. Santin, Rosema. III. Troncarelli, Marcella Zampoli. IV. Reis, Ana Carolina Gonçalves dos. V. Instituto Federal Catarinense. Programa de Pós-graduação em Produção e Sanidade Animal. VI. Título.

Juliana Grandi

**Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) frente a
microorganismos isolados de casos de otite externa em cães**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências, Curso de Pós-Graduação Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense.

Data da Defesa: 12/07/2018

Banca examinadora:

Prof. Dr. Eduardo Negri Mueller (Orientador)

Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Prof^a. Dr^a. Márcia de Oliveira Nobre

Doutor em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof^a. Dr^a. Soraya Regina Sacco Surian

**Doutor em Medicina Veterinária pela Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita
Filho**

Prof^a. Dr^a. Elizabeth Schwegler

Doutor em Veterinária pela Universidade Federal de Pelotas

Dedicatória

Aos meus pais e esposo,
pelo amor, carinho, incentivo e apoio

Agradecimentos

Eis que chega a oportunidade de agradecer a quem me ajudou a alcançar este objetivo. A todos que contribuíram direta ou indiretamente para construção deste projeto, minha sincera gratidão.

Inicio os agradecimentos por Deus, por nunca ter me faltado saúde e coragem para enfrentar os desafios até o final desta trajetória. Agradeço por me proporcionar a magia da vida, permitindo crescer em meu ventre um amor eterno e incondicional.

Ao meu filho Francisco, agradeço por me tornar uma pessoa melhor. Minha felicidade por ser mãe pela primeira é indescritível e foi esse sentimento o maior responsável por me proporcionar força para elaborar a presente dissertação de mestrado.

Ao meu esposo, Eduardo, por todo amor, carinho, companheirismo e palavras de incentivo. Cada minuto ao teu lado foi de extrema importância para me dar garra e coragem.

Não posso deixar de agradecer a minha companheirinha de quatro patas, Bella. Obrigada por sempre estar deitadinha ao meu lado em todos os momentos que redigia esta dissertação.

Aos meus pais, Enio e Iris, que sempre oportunizaram e incentivaram minha trajetória acadêmica. Obrigada pai e mãe por toda confiança, amor e por sempre respeitarem minhas escolhas.

Agradeço ao meu irmão, cunhada e sobrinhos por sempre me apoiarem e compreenderem os momentos de ausência.

Ao meu orientador, Prof. Eduardo Negri Mueller, por todo suporte, paciência, incentivo e ensinamentos essenciais para realização deste projeto. Muito obrigada por acreditar em minha capacidade.

Às co-orientadoras, professoras Marcella Zampoli Troncarelli, Rosema Santin e Ana Carolina Gonçalves dos Reis por todas orientações prestadas, compreensão, disponibilidade e igualmente pelo apoio na elaboração desta dissertação.

A todos que trabalham no Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal Catarinense - *Campus* Concórdia, pela ajuda durante a fase experimental do projeto, em

especial à servidora Eliete Griebeler e à bolsista de iniciação científica, Caroline Rosa Monteiro.

À mestranda Risciela Salardi Alves de Brito, por toda ajuda e tempo despendido para o desenvolvimento do experimento.

Aos amigos e colegas Giana, Suelen, Douglas e Mariane pela parceria nos estudos, incentivo e momentos de muitas risadas. Minha gratidão a Gi, pelo ombro amigo e ajuda com os empréstimos de livros.

Às amigas Tainara, Sirlei e Carine por me apoiarem durante toda esta jornada, pelas horas de conversa e momentos de distração.

Ao colega e amigo Rodrigo Antônio Pivatto e sua família por me acolherem nos momentos que tanto precisei. Ro, obrigada pela amizade sincera, pelo incentivo e por não medir esforços para me ajudar.

Ao Instituto Federal Catarinense e a todos servidores do Programa de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal.

***"Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você
estará fazendo o impossível."***

São Francisco de Assis

Resumo

GRANDI, Juliana. **Atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) frente a microrganismos isolados de casos de otite externa em cães.** 2018. 34f. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Curso de Pós-Graduação em Produção e Sanidade Animal, Pró-reitora de Pesquisa, Pós-Graduação e Inovação, Instituto Federal Catarinense, Concórdia, 2018.

A otite externa em cães é um processo inflamatório que atinge o conduto auditivo externo e apresenta elevada casuística na clínica médica veterinária de pequenos animais. O tratamento tem sido desafiador, já que essa enfermidade possui etiologia multifatorial, incluindo fatores primários, predisponentes e perpetuantes. Os fatores perpetuantes incluem as bactérias *Staphylococcus* coagulase positiva e a levedura *Malassezia pachydermatis*. Atualmente, a resistência microbiana aos medicamentos convencionais é um agravante no quadro dessa enfermidade. Nesse caso, o uso de plantas com potencial medicinal, como o *Allium sativum* L., devem ser consideradas como parte da terapêutica. Portanto, este estudo objetivou avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* do extrato aquoso de alho frente a microrganismos isolados a partir de casos de otite externa em cães. Para realização desse estudo, utilizou-se dez isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva e doze de *Malassezia pachydermatis* processadas na rotina diagnóstica do Laboratório de Microbiologia do Instituto Federal Catarinense, Campus Concórdia. Para produção do extrato aquoso de alho foi adquirido material vegetal de distribuidor comercial. Para realização dos testes *in vitro* utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo com objetivo de obter a concentração inibitória mínima (CIM) bacteriana e fúngica, além da concentração fungicida mínima (CFM). O extrato aquoso de alho inibiu o crescimento de todos os isolados. A CIM dos isolados bacterianos variou de 93,75 a 375mg/mL e dos isolados fúngicos variou de 5,86 a 46,87mg/mL. Já a CFM variou de 5,86 a 375mg/mL. Conclui-se que o extrato aquoso de alho apresenta atividade antimicrobiana *in vitro* frente aos principais microrganismos isolados a partir de casos de otite externa canina.

Palavras-chave: otopatia; planta; resistência microbiana; *Staphylococcus* coagulase positiva; *Malassezia pachydermatis*.

Abstract

GRANDI, Juliana. ***In vitro* antimicrobial activity of garlic (*Allium sativum* L.) aqueous extract against microorganisms isolated from external otitis in dogs.** 2018. 34f. Masters dissertation (Master in Science) – Post-graduation in Animal Production and Health; Pro-rectory of Research, Post-graduation and Innovation; Federal Institute (Santa Catarina State), Concórdia, Brazil, 2018.

External otitis is an inflammatory process that involves the external auditory canal, with high prevalence in small animals' veterinary medicine. Treatment has been difficult, due its multifactorial etiology represented by primary, predisposing and perpetuating factors. Infectious agents as coagulase positive *Staphylococcus* (CPS) and *Malassezia pachydermatis* (*M. pachydermatis*) are examples of perpetuating factors. Actually, the microbial resistance to conventional drugs represents an aggravating process on this disease. In this case, the use of plants with medicinal properties, as garlic (*Allium sativum* L.) may be considered as part of therapeutically measures. Thus, the objective of the present study was to evaluate the *in vitro* antimicrobial potential of garlic aqueous extract against microorganisms isolated from external otitis in dogs. For this purpose, it were used 10 CPS and 12 *M. pachydermatis* strains, obtained from Laboratory of Veterinary Microbiology of Federal Institute (Santa Catarina State), Concórdia, Brazil. These strains were isolated from canine external otitis and belonged to the lab's bacteriotheca. For aqueous extract production, the garlic samples were obtained from a commercial distributor. The microdilution technique was used for Minimum Inhibitory Concentration (MIC) evaluations, for both bacterial and yeast. The Minimum Fungicide Concentration (MFC) was evaluated for *M. pachydermatis*. The garlic aqueous extract inhibited the growth of all isolates. The MIC values against bacterial and fungi isolates ranged from 93.75 to 375mg/mL, and from 5.86 to 46.87mg/mL, respectively. The MFC ranged from 5.86 to 375mg/mL. It was possible to conclude that the garlic aqueous extract presents *in vitro* antimicrobial activity against the main microorganisms isolated from external otitis in dogs.

Keywords: otopathy; plant; microbial resistance; coagulase positive *Staphylococcus*; *Malassezia pachydermatis*.

Lista de Abreviaturas e Siglas

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
mg	Miligrama
mL	Mililitro
µg	Micrograma
µL	Microlitro
%	Porcentagem

Lista de Símbolos

°C	Grau Celsius
®	Marca registrada

SUMÁRIO

1	CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE.....	12
2	OBJETIVOS.....	17
2.1	Geral.....	17
2.2	Específicos.....	17
3	ARTIGO.....	18
3.1	Resumo.....	18
3.2	Introdução.....	19
3.3	Material e Métodos.....	21
3.4	Resultados e Discussão.....	23
3.5	Conclusão.....	26
4	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	27
5	REFERÊNCIAS.....	28
6	ANEXOS.....	34

1 CONTEXTUALIZAÇÃO DO PROBLEMA E ESTADO DA ARTE

A otite externa canina é uma inflamação aguda ou crônica que acomete o canal auditivo externo do ouvido, sendo uma doença relativamente comum em cães. Devido a complexidade da sua etiopatogenia, que envolve um alto número de fatores capazes de causar ou contribuir para o seu desenvolvimento, o diagnóstico torna-se, muitas vezes, um desafio para o médico veterinário. Os fatores que levam ao aparecimento dessa afecção inflamatória podem ser classificados como primários, predisponentes e perpetuantes (Rosychuk & Luttgen, 2004).

Os fatores primários são responsáveis por iniciar uma inflamação em orelhas normais, com destaque para as hipersensibilidades (Patel & Forsythe, 2010). Todavia, corpos estranhos, ectoparasitas, doenças autoimunes, otite idiopática inflamatória, distúrbios das glândulas sebáceas e neoplasias também podem desencadear essa otopatia (Rosser, 2004).

A etiologia da otite externa em cães pode ser determinada por causas capazes de tornarem o ouvido externo mais suscetível, colocando o animal em um maior risco de desenvolver a doença. Esses fatores são conhecidos como predisponentes e compreendem elevações de umidade e temperatura dentro do canal auditivo, conformações anatômicas do conduto do ouvido, doenças que causam obstrução do ouvido externo (Werner, 2005), além de variações climáticas, erros de tratamento, pirexia e doenças sistêmicas (August, 1988).

Os fatores perpetuantes são os responsáveis por dar continuidade à doença. As infecções causadas por bactérias e leveduras destacam-se entre esses motivos, pois dificultam ao médico veterinário alcançar o êxito terapêutico (Patel & Forsythe, 2010). As alterações patológicas progressivas e a otite média canina também podem ser consideradas como agentes perpetuantes (Murphy, 2001).

A microbiota comensal do canal auditivo externo canino é constituído por baixo número de microrganismos. As bactérias Gram-positivas, principalmente as *Staphylococcus* coagulase positiva, e a levedura *Malassezia pachydermatis* são os predominantes. Esses microrganismos podem ser os responsáveis por causar a otite externa em cães, pois são considerados agentes oportunistas, os quais aproveitam-se de alterações do microambiente do meato acústico, favorecendo a modificação de ação do agente da forma comensal para a parasitária ou patogênica (Nobre, 1998; Harvey et al., 2004; Almeida 2016).

As espécies bacterianas isoladas com maior frequência em caso de otite externa canina são as *Staphylococcus* coagulase positiva, as quais destacam-se *S. intermedius*, *S. aureus*, *S. hycus*, *S. schleiferi*, , *S. epidermidis*, *S. simulans* e *S. saprophyticus* (Santos, 2007; Penna et al., 2009; Dégi et al., 2013). Já a levedura isolada mais comumente nessa otopatia é a *Malassezia pachydermatis* (Nobre, 1998; Santos, 2007).

As recidivas de otite externa canina ocorrem, principalmente, pelos fatores primários e os predisponentes não serem levados em consideração (Murphy, 2001). Os microrganismos são capazes de dar continuidade à inflamação do canal auditivo, mas dificilmente, são a causa inicial da doença. Dessa maneira, o tratamento baseado apenas em medicamentos tópicos compostos por antimicrobianos podem resolver o problema momentaneamente (August, 1988).

Na clínica médica de pequenos animais o tratamento para a otite externa canina com envolvimento infeccioso é um grande desafio, já que a resistência microbiana é um problema cada vez mais comum. O rápido desenvolvimento da resistência microbiana aos fármacos disponíveis no mercado deve-se ao uso frequente dos mesmos medicamentos e pela ausência de realização de cultura bacteriana e teste de susceptibilidade (Rosser, 2004; Dégi et al., 2013; Penna et al., 2009; Zur et al., 2016).

Esse mecanismo está relacionado à existência de genes contidos no microrganismo que codificam reações bioquímicas capazes de impedir a ação do fármaco. A resistência pode provir de mutações durante a reprodução do microrganismo, resultando em sequências erradas de bases genéticas que formam o DNA cromossômico e são responsáveis pelo código genético (Cunha, 1998).

Devido as preocupações com o uso indiscriminado de fármacos alopáticos e a incapacidade de se chegar ao êxito terapêutico, formas alternativas de tratamento devem ser estudadas, dentre elas, o uso de plantas potencialmente medicinais (Nogueira et al., 2008; Vingopoulou et al., 2014; Zur et al., 2016).

Plantas medicinais são vegetais utilizados com objetivo terapêutico. Já os fitoterápicos, são os resultados da industrialização dessas plantas, tornando-as um medicamento. (Brasil, 2011).

Estudos sobre o uso de extratos vegetais em medicina veterinária vêm demonstrando resultados bastante favoráveis. Pesquisas estão sendo realizadas com objetivo de estudar a eficácia de extratos de plantas com potenciais medicinais no tratamento de patologias veterinárias, como a otite externa em cães. As ações de plantas, como o nim (*Azadirachta indica*), a copaíba (*Copaifera reticulata*), o trigo (*Triticum aestivum*), o alecrim (*Rosmarinus officinalis*), o orégano (*Origanum vulgare*), a aroeira (*Schinus terebinthifolius, Raddi*), foram estudadas e seus resultados foram satisfatórios, obtendo resultados antibacterianos e antifúngicos frente a diferentes isolados de otite externa em canina (Malcher et al., 2012; Ziech et al., 2013; Fontoura, 2014; Santin et. al., 2014).

Dentre as plantas medicinais, o alho é uma das mais eficazes na substituição dos medicamentos sintéticos. A nomenclatura botânica oficial desse vegetal é *Allium sativum* L. (Brasil, 2016) e possui grande importância como especiaria. Entretanto, nos últimos anos, sua demanda e valorização econômica aumentaram não apenas devido a essa finalidade, mas também pelas qualidades terapêuticas que apresenta (Tepe et al., 2005). Ao longo dos anos foi se

descobrimo a capacidade de cura que o bulbo desse condimento apresenta. Os efeitos terapêuticos do alho são comprovados em muitas pesquisas (Almeida et al., 2004; Corzo-Martínez et al., 2007; Chagas et al., 2012; Grosso et al., 2013).

Em 2014, através da Instrução Normativa nº 2, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado, incluindo o *Allium sativum* L. Nesse documento, o alho é indicado como coadjuvante no tratamento da hiperlipidemia e hipertensão arterial e auxiliar na prevenção de aterosclerose.

Vários componentes bioativos proporcionam ao alho seus efeitos terapêuticos. Foram identificados trinta e três compostos organossulfurados. A aliina, um aminoácido inodoro, é convertido pela enzima alinase em alicina quando o bulbo do alho é triturado ou esmagado. A alicina (dialil-tiosulfinato) é o elemento mais ativo e o responsável pelo odor característico. Ao se decompor, forma numerosos compostos sulfurados, dentre os quais alguns conferem ao alho suas propriedades funcionais, como ação antibiótica, antifúngica e antiviral (Gomez & Sanchez-Muniz, 2000). Por esta substância ser utilizada como referência no controle de qualidade da matéria prima, ela é considerada o marcador do alho (Brasil, 2014).

As ações terapêuticas do alho são conhecidas há muito tempo. Em 1858, Pasteur já havia relatado a capacidade de inibir o crescimento de algumas bactérias (Quintaes, 2001). A alicina é capaz de combater um amplo espectro de bactérias, tanto Gram-negativas, quanto Gram-positivas, incluindo *Escherichia coli* (Santiago et al., 2011); *Streptococcus* spp. (Groppo et al., 2007; Groppo et al., 2007); *Staphylococcus* spp. (Iwalokun et al., 2004; Snowden et al., 2014); *Bacillus* spp. (Silva et al., 2012), dentre outras (Uchida et al., 1975). O *Allium sativum* L. também é capaz de potencializar a ação de alguns antibióticos, como vancomicina, tetraciclina e gentamicina. Essa associação é promissora para o tratamento de infecções bacterianas (Almeida et al., 2013).

O efeito antifúngico de extratos de alho frente a diferentes fungos também foi demonstrado em diferentes estudos. Já foram relatadas ações antifúngicas frente a *Cryptococcus neoformans* (Davis et al., 1994), a *Candida*, *Cryptococcus*, *Trichophyton*, *Epidermophyton* e *Microsporum* (Yamada & Azuma, 1977), a *Fusarium proliferatum* (Souza et al., 2007), a *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp. (Silva et al., 2010b), a *Alternaria alternata* e *Alternaria dauci* (Lima et al., 2016). A maioria dessas pesquisas tiveram como objetivo investigar os efeitos do extrato aquoso de alho em fungos que afetam o cultivo de plantas. Porém, os estudos não ficam restritos apenas a agricultura. Há relatos do efeito fungicida do alho em estudos na área da saúde. Diferentes espécies de *Candida* sofreram inibição frente ao extrato de alho (Ebrahimi et al., 2015; Mendoza-Juache et al., 2017). Em relação ao gênero *Malassezia*, há estudos sobre o efeito antimicrobiano do alho para a levedura *M. furfur* (Shams-Ghahfarokhi et al., 2006, Sanad & Mabrouk, 2016). Porém, não foi encontrado pesquisas referentes à *M. pachydermatis*.

Diante do exposto, se faz necessário elaborar mais pesquisas com objetivo de avaliar os efeitos terapêuticos dos extratos provenientes de plantas. Tratando-se de uma doença com dificuldades para alcançar um tratamento bem sucedido e tendo em vista que seus fatores perpetuantes possuem resistência a diversos medicamentos convencionais, a otite externa canina merece atenção dos pesquisadores.

2 OBJETIVOS

2.1 Geral

Avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* do extrato aquoso de alho frente a microrganismos isolados a partir de casos de otite externa em cães.

2.2 Específicos

Verificar a sensibilidade dos isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva e *Malassezia pachydermatis* ao extrato aquoso de alho pelo método de microdiluição em caldo;

Determinar a concentração inibitória mínima (CIM), a concentração bactericida mínima (CBM) e a concentração fungicida mínima (CFM) do extrato aquoso de alho frente a *Staphylococcus* coagulase positiva e a *Malassezia pachydermatis*.

3 ARTIGO

Avaliação da atividade antimicrobiana *in vitro* de extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) frente a microrganismos isolados de casos de otite externa em cães

Artigo submetido à Revista Medicina Veterinária (UFRPE)

(<http://www.journals.ufrpe.br/index.php/medicinaveterinaria>)

Autores

Juliana Grandi, Risciela Salardi Alves de Brito, Ana Carolina Gonçalves dos Reis,
Rosema Santin, Marcella Zampoli Troncarelli, Eduardo Negri Mueller

3.1 Resumo

As otopatias são frequentes em animais de companhia e, muitas vezes, de difícil tratamento, já que existe uma grande variedade de agentes perpetuantes. Muitos destes microrganismos são resistentes aos fármacos disponíveis. O uso de extratos vegetais pode ser uma alternativa à substituição de medicamentos alopáticos para tratamento de otite externa em cães. O presente estudo teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* do extrato aquoso de alho frente aos microrganismos isolados a partir de casos de otite externa em cães. Para realização do projeto, foram utilizadas dez amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva e doze de *Malassezia pachydermatis* obtidas de isolados clínicos de otite externa canina. Foram realizadas diluições seriadas do extrato aquoso de alho entre 1,46 a 750mg/mL para o CIM bacteriano e 0,73 a 375mg/mL para CIM fúngico. O estudo obteve resultados satisfatórios, no qual todos isolados foram inibidos pelo extrato aquoso de alho. Observou-se inibição a partir da concentração 93,7mg/mL para bactérias e 5,86mg/mL para leveduras. Os resultados obtidos confirmam o efeito antibacteriano e antifúngico

frente aos microrganismos estudados. Pode-se concluir que o extrato aquoso de alho apresenta potencial antimicrobiano *in vitro* frente a SCP e *M. pachydermatis* isolados de casos de otite externa canina.

3.2 Introdução

A otite externa se caracteriza pela inflamação do canal auditivo externo, podendo atingir a concha acústica. Está entre as enfermidades com maior casuística na clínica médica de pequenos animais devido à grande variedade de fatores perpetuantes que dificultam sua cura (Patel & Forsythe, 2010).

Os fatores que levam à otite externa podem ser divididos em três grupos: primários, predisponentes e perpetuantes. As causas primárias são os fatores responsáveis por iniciar processo inflamatório em ouvidos saudáveis, dentre os quais estão a presença de parasitas auriculares, corpos estranhos nos ouvidos, hipersensibilidades, doenças alérgicas, desordens de queratinização e doenças autoimunes (Rosser, 2004). Os fatores predisponentes são os que aumentam os riscos de desenvolver a inflamação, porém não causam otite por si só, como anatomia e conformação do canal auditivo, umidade excessiva no conduto do ouvido, variações climáticas, erros de tratamento, doença do ouvido obstrutivo, piroxia e doenças sistêmicas (August, 1988). Os fatores perpetuantes são capazes de dar continuidade à resposta inflamatória. Dentre as causas perpetuantes destacam-se os microrganismos (Patel & Forsythe, 2010), especialmente as bactérias *Staphylococcus coagulase positiva* (SCP) e a levedura *Malassezia pachydermatis* (Santos, 2007). Além desses agentes, alterações patológicas progressivas e otite média também são considerados fatores perpetuantes (Werner, 2005).

A principal causa de otite externa recidivante ocorre por não haver identificação dos fatores primários e/ou predisponentes (Murphy, 2001). Os medicamentos tópicos usados para tratar essa otopatia contém, na maioria das vezes,

um ou mais antimicrobianos. Porém, na maioria dos casos, como os microrganismos são considerados agentes perpetuantes e não desencadeantes, podem ocorrer recorrências da doença após o final do tratamento (August, 1988). A permanência em não buscar conhecimento dos fatores que causaram inicialmente a inflamação do canal auditivo leva, por diversas vezes, a repetição dos tratamentos. E, dessa maneira, as bactérias e leveduras tornam-se resistentes aos vários agentes antimicrobianos tópicos (Rosser, 2004).

Tendo em vista a elevada casuística de otite externa em cães, a ocorrência de recidivas e a resistência dos microrganismos aos fármacos alopáticos, faz-se necessário encontrar tratamentos alternativos para essa enfermidade (Vingopoulou et al., 2014; Zur et al., 2016).

As ações terapêuticas de fitoterápicos já foram estudadas em casos de otite externa, e seus resultados foram satisfatórios, relatando a eficácia antibacteriana e antifúngica frente a diferentes isolados (Malcher et al., 2012; Ziech, et al., 2013; Santin et al., 2014).

Dentre os extratos vegetais, destaca-se o alho na substituição dos medicamentos sintéticos, já que estudos demonstram várias de suas ações terapêuticas (Almeida et al., 2004; Corzo-Martínez et al., 2007; Chagas et al., 2012). Em 2014, através da Instrução Normativa nº 2, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou a lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado, incluindo o *Allium sativum* L. Nesse documento, o alho é indicado como coadjuvante no tratamento da hiperlipidemia e hipertensão arterial e auxiliar na prevenção de aterosclerose.

Diante desse contexto, objetivou-se avaliar o potencial antimicrobiano *in vitro* do extrato aquoso de alho frente a microrganismos isolados a partir de casos de otite externa em cães.

3.3 Material e Métodos

O projeto foi conduzido no Laboratório de Microbiologia Veterinária, do Instituto Federal Catarinense (IFC), *Campus Concórdia*. Foram utilizados dez isolados de *Staphylococcus* coagulase positiva (SCP) e doze de *Malassezia pachydermatis* processados na rotina diagnóstica do laboratório, obtidos de casos clínicos de otite externa canina.

Para as avaliações utilizaram-se amostras de alho (*Allium sativum* L.) adquirido de distribuidor comercial registrado (M.A.R.A. 20013-1) e com rastreabilidade da origem. Estes produtos eram pertencentes ao grupo nobre, sub grupo roxo, tipo especial e da classe 4. O extrato aquoso de alho foi obtido segundo metodologia descrita por Groppo et al. (2007) e Venâncio et al. (2017) com modificações. Em um liquidificador foram triturados, por 10 minutos, 100g de bulbo de alho com adição de 100 mL de água destilada. Após, esse material foi centrifugado a 3000 rpm, por 20 minutos. O sobrenadante sofreu decantação e, por fim, o extrato aquoso foi filtrado e esterilizado. Para filtração, utilizou-se peneira de plástico, além de filtro de papel. Ao final, membranas Millipore® (MERK) com 0,22µm de diâmetro de poro foram utilizadas para esterilizar o extrato.

Utilizou-se a técnica de microdiluição para avaliar o potencial antimicrobiano do alho, determinando a concentração inibitória mínima (CIM) bacteriana e fúngica e a concentração fungicida mínima (CFM). O extrato aquoso foi testado nas concentrações seriadas de 1,46 a 750mg/mL para a CIM bacteriana e 0,73 a 375mg/mL para a CIM fúngica. Todos isolados foram testados em duplicata e, tanto os resultados das CIMs, como da CFM, foram expressos pela média das duplicatas.

Para obtenção da CIM bacteriana foi utilizada a metodologia segundo Sarker et al. (2007). Para preparação dos inóculos, as colônias foram suspensas em solução salina 0,9% e homogeneizadas em vórtex, sendo sua turbidez ajustada na escala 0,5 de Mc Farland. Na primeira coluna de poços foram adicionados 100µL do extrato na

concentração de 750mg/mL. Nos demais poços foram colocados 50µL de solução salina. Após, foi realizada diluição seriada (base 2). Foi adicionado 10µL de solução resazurina (270mg/40mL) em todos poços para facilitar a leitura, já que esse corante é um indicador de atividade metabólica e de proliferação de células viáveis. Por fim, foram acrescentados 30µL de caldo BHI e 10µL de inóculo bacteriano em todos os poços. Depois de preenchidas, as microplacas foram vedadas com filme 3M (próprio para laboratório) e incubadas a 37°C por 24 horas para realização da leitura da CIM. As últimas duas colunas de poços foram utilizadas para realização dos controles, a saber: multiplicação bacteriana; inibição bacteriana (utilização de antimicrobiano comercial na concentração de 250µg/mL); esterilidade do meio de cultura; esterilidade do extrato aquoso de alho.

Em relação às leveduras, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM), utilizou-se metodologia de Santin et al. (2014) adaptada. Para preparação dos inóculos, as colônias foram suspensas em solução salina 0,9%, homogeneizadas em vórtex e sua turbidez ajustada na escala 1 de Mc Farland. A partir dessa solução foi realizada diluição de 1:50 em solução salina e após uma diluição de 1:20 em caldo Sabouraud, a qual foi dispensada em alíquotas de 100µL nos poços das microplacas, com exceção do controle negativo. Em todos os poços foram colocados 100µL de meio caldo Sabouraud. Foram adicionados 100µL do extrato em todos poços com exceção da primeira coluna. Realizou-se a diluição seriada a partir da segunda até a penúltima coluna. A primeira coluna recebeu apenas o meio de cultura (controle negativo) e a na última foram dispensados meio de cultura e inóculo (controle positivo). Após ter concluído o preenchimento, as microplacas foram cobertas com um filme de PVC, incubadas a 37°C por 72 horas para realização da leitura da CIM. Posteriormente, foram transferidos 10µL de cada poço para placas de Petri com ágar Sabouraud dextrose e incubados a 37°C por 72 horas para leitura da CFM. Para o controle antifúngico foram realizadas preparações semelhantes em

microplacas. No entanto, ao invés do alho, colocou-se cetoconazol nas concentrações seriadas de 0,046 a 1,5µg/mL nos poços com os inóculos.

3.4 Resultados e Discussão

Em geral, as bactérias isoladas com maior frequência de casos de otites externas em cães são *Staphylococcus* coagulase positiva (Harvey et al., 2004; Santos, 2007; Dégi et al., 2013). Em relação às leveduras, *Malassezia pachydermatis* é o agente mais isolado (Harvey et al., 2004; Santos, 2007). Esses agentes perpetuantes fazem parte da microbiota do ouvido, porém se multiplicam em canais auditivos inflamados quando há alteração do microambiente do meato acústico, favorecendo a modificação de ação do agente da forma comensal para a parasitária ou patogênica (Patel & Forsythe, 2010).

Todos os isolados foram inibidos pelo extrato aquoso de alho. Os resultados obtidos nos testes de atividade microbiana *in vitro* sugerem o efeito antibacteriano e antifúngico desse extrato frente a SCP e *Malassezia pachydermatis*.

Os resultados foram apresentados de acordo com a menor concentração capaz de inibir o crescimento (CIM) ou eliminar cada microrganismo (CFM). A CIM dos dez isolados bacterianos variou de 93,75 a 375mg/mL. Duas amostras (n = 2) obtiveram a CIM de 93,75mg/mL, sete (n = 7) de 187,5mg/mL e uma (n = 1) de 375mg/mL.

Os valores de CIM para SCP apresentado no presente estudo foram superiores aos descritos em estudos anteriores para cepas isoladas de humanos e para cepa padrão de *Staphylococcus aureus* (Iwalokun et al., 2004; Snowden et al., 2014). Estes resultados reforçam que a ação antimicrobiana do extrato aquoso de alho pode sofrer variações, de acordo com a espécie bacteriana e/ou da espécie animal pela qual o agente foi isolado (o que também ocorre com antimicrobianos alopáticos). Além disso, diferentes maneiras de produzir o extrato aquoso de alho também podem determinar diferença nos valores de CIM (Rodrigues et al., 2009). Com isso, torna-se necessária a

padronização industrial para obtenção do fitoterápico, de forma a reduzir essas variações.

Utilizando uma metodologia para produção do extrato aquoso de alho semelhante à do nosso estudo, alguns autores relatam atividade antimicrobiana frente a *S. aureus* (Venâncio et al., 2017) e a cepas distintas de *Streptococcus* (Groppo et al., 2002; Groppo et al., 2007).

Para os doze isolados de *Malassezia pachydermatis*, a CIM variou de 5,86 a 46,87mg/mL, sendo de 5,86mg/mL para duas amostras (n = 2), 11,72mg/mL para outras duas (n = 2), 17,58mg/mL para três isolados (n = 3), 23,44mg/mL para quatro (n = 4) e 46,87mg/mL para uma amostra (n = 1). Com relação à CFM, apresentou variação de 5,86 a 375mg/mL. Uma amostra (n = 1) obteve a CIM de 5,86mg/mL, uma (n = 1) de 11,72mg/mL, cinco (n = 5) de 23,44mg/mL, uma (n = 1) de 46,87mg/mL, três (n = 3) de 93,75mg/mL e uma (n = 1) de 375 mg/mL. No controle antifúngico, todos os isolados foram inibidos pelas diferentes concentrações do cetoconazol.

A atividade fungicida do alho tem sido relatada frente a diversas espécies de fungos (Yamada e Azuma, 1977; Davis et al., 1994; Souza et al., 2007; Silva et al., 2010b), porém há poucos relatos de ação frente as espécies do gênero *Malassezia*, tendo estudos apenas com a *M. furfur* (Shams-Ghahfarokhi et al., 2006, Sanad & Mabroux, 2016). Não foi encontrado artigo referente a atividade antimicrobiana do *Allium sativum* L. frente a *M. pachydermatis*.

A variação dos resultados (CIM e CFM) desta pesquisa pode estar relacionada à variabilidade genética entre as cepas de microrganismos avaliadas e, conseqüentemente, à complexidade de inflamação auricular causada por estes patógenos. Possivelmente, os casos clínicos variaram de agudos a crônicos. Sendo assim, infere-se que os isolados que demandaram maior concentração de extrato aquoso de alho para serem inibidos foram provenientes de casos crônicos e recidivantes, como também sugerem Santin e colaboradores (2014).

As ações terapêuticas do *Allium sativum* L. têm sido descritas e comprovadas por meio de estudos. Em 1858, Pasteur já havia relatado os efeitos bactericidas desta especiaria (Quintaes, 2001). Espécies de *Staphylococcus* estão entre as bactérias estudadas, principalmente *S. aureus* (Quintaes, 2001; Gomaa & Hashish, 2003; Santiago et al., 2011). Segundo Tepe et al. (2005), o alho teve sua importância econômica aumentada nos últimos anos, não apenas pela sua utilidade como especiaria, mas também, devido às suas qualidades terapêuticas, atribuídas aos seus compostos bioativos.

Embora não tenham sido avaliados os compostos ativos do extrato aquoso, já foram relatados por outros autores a composição do alho (Dalonso et al., 2009; Silva et al., 2010a; Bose et al., 2014; Lanzotti et al., 2014; Fratianni et al., 2016). Dentre esses, a alicina é conhecida por formar compostos sulfurados, que conferem ao alho suas propriedades funcionais, tal como a antimicrobiana (Borlinghaus et al., 2014). O bulbo do alho intacto contém o aminoácido aliina, que é convertido pela enzima alinase em alicina, quando triturado ou esmagado (Gómez & Sánchez-Muniz, 2000). Venâncio et al. (2017) analisaram o extrato aquoso de alho e relataram que 82% dos compostos são sulfurosos. Sabe-se, porém, que as concentrações dos compostos ativos podem variar conforme condições climáticas, solo e época da coleta (Simões et al., 2010). Neste caso, optou-se no presente estudo a avaliar um produto de mesmo distribuidor comercial, de forma a minimizar tal variação.

Em nosso país existe uma grande quantidade de plantas potencialmente medicinais com considerável aceitação pela população, porém estudos realizados na área de medicina veterinária ainda são escassos. A busca pela diminuição de efeitos colaterais provocados pelos fármacos alopáticos contribui para o aumento no consumo de fitoterápicos no Brasil (Ozaki & Duarte, 2006). Inclusive, órgãos públicos estão divulgando estudos que demonstram as ações terapêuticas dos fitoterápicos (Brasil, 2011). Para o uso seguro e eficaz das plantas medicinais, a ANVISA publicou em

2016 o Memento Fitoterápico da Farmacopéia Brasileira visando a incentivar a fabricação ou manipulação destes medicamentos (Brasil, 2016).

Nesta pesquisa demonstrou-se a atividade antibacteriana e antifúngica do extrato aquoso de *Allium sativum* L. em casos de otite externa canina. Infere-se, portanto, ação antimicrobiana desse extrato no tratamento de otites externas em cães, com promissor potencial terapêutico, contribuindo assim para a redução da pressão de seleção artificial de microrganismos causada pela utilização dos fármacos convencionais. O extrato aquoso de alho apresenta-se como uma alternativa viável, devendo receber especial atenção das empresas farmacêuticas.

3.5 Conclusão

Com o presente estudo pode-se concluir que o extrato aquoso de alho (*Allium sativum* L.) apresenta potencial antimicrobiano *in vitro* frente a *Staphylococcus* coagulase positiva e *Malassezia pachydermatis* isolados de casos de otite externa canina, apresentando-se como uma alternativa viável para o desenvolvimento de novos fitoterápicos a serem utilizados em Medicina Veterinária de pequenos animais.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato aquoso de alho foi capaz de inibir todos os isolados de casos de otite externa canina. Tanto as amostras de *Staphylococcus* coagulase positiva, quando as de *Malassezia pachydermatis* obtiveram concentração inibitória mínima. A CIM das bactérias variou de 93,75 a 375mg/mL, enquanto a CIM fúngica variou de 5,86 a 46,87mg/mL. A menor CFM obteve o valor de 5,86% e a maior concentração foi de 375mg/mL.

O presente estudo demonstrou que o extrato aquoso de alho possui atividade antibacteriana e antifúngica *in vitro* frente a SCP e *M. pachydermatis* isolados de casos de otite externa em cães.

Esse extrato possui potencial terapêutico e apresenta-se como uma alternativa viável, devendo receber atenção das empresas farmacêuticas e da Agência Nacional de Vigilância Sanitária.

5 REFERÊNCIAS

ALMEIDA, G.D.; GODOI, E.P.; SANTOS, E.C.; LIMA, L.R.P.; OLIVEIRA, M.E. Extrato aquoso de *Allium sativum* potencializa a ação dos antibióticos vancomicina, gentamicina e tetraciclina frente *Staphylococcus aureus*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 34(4), 487-492, 2013.

ALMEIDA, M.A.O.; SIMAS, M.M.S.; BOTURA, M.B.; BITIENCOURT, T.C.B.S.C.; SILVA, A.; BATATINHA, M.J.M. Avaliação *in vitro* dos efeitos do extrato alcoólico e do suco de alho (*Allium sativum* L.) sobre nematódeos gastrintestinais de caprinos. **Ciência Veterinária nos Trópicos**. 7 (1), 36-43, 2004.

ALMEIDA, M.S.; SANTOS, B.S.; 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**. 36(1), 29-32, 2016.

AUGUST, J.R. Otitis externa: a disease of multifactorial etiology. **Veterinary Clinics Of North America: Small Animal Practice**. 18(4), 731-742, 1988.

BORLINGHAUS, J.; ALBRECHT, F.; GRUHLKE, M.C.H.; NWACHUKWU, I.D.; SLUSARENKO, A.J. Allicin: chemistry and biological properties. **Molecules**. 19(8), 12591-12618, 2014.

BOSE, S.; LAHA, B.; BANERJEE, S. Quantification of allicin by high performance liquid chromatography-ultraviolet analysis with effect of post-ultrasonic sound and microwave radiation on fresh garlic cloves. **Pharmacognosy Magazine**. 10(38), s288-s293, 2014.

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Memento Fitoterápico: Farmacopéia Brasileira**. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 114 p, 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instrução Normativa Nº 02, de 13 de maio de 2014**. Publica a "Lista de medicamentos fitoterápicos de registro simplificado" e a "Lista de produtos tradicionais fitoterápicos de registro simplificado". Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3295949/IN_02_2014_COMP.pdf/173d7c28-f985-4976-b8b5-268d911e997a?version=1.0>. Acessado em: 24 nov. 2017.

CHAGAS, F.C.; ZANETTI, J.F.; OLIVEIRA, V.C.; DONATINI, R.S. *Allium sativum* L. na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares. **Biofar: Revista de Biologia e Farmácia**. 7(2), 1-11, 2012.

CORZO-MARTINEZ, M.; CORZO, N.; VILLAMIEL, M. Biological properties of onions and garlic. **Trends In Food Science & Technology**. 18(12), 609-625, 2007.

CUNHA, B.A. Antibiotic resistance. **Drugs of Today**. 34, 691-698, 1998.

DALONSO, N.; IGNOWSKI, E.; MONTEIRO, C.M.A.; GELSLEICHTER, M.; WAGNER, T.M.; SILVEIRA, M.L.L.; SILVA, D.A.K. Extração e caracterização de carboidratos presentes no alho (*Allium sativum* L.): proposta de metodologia alternativa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. 29(4), 793-797, 2009.

DAVIS, L.; SHEN, J.; ROYER, R. *In vitro* synergism of concentrated *Allium sativum* extract and amphotericin b against *Cryptococcus neoformans*. **Planta Medica**. 60(6), 546-549, 1994.

DÉGI, J. IMRE, K.; CĂȚANĂ, N.; MORAR, A.; SALA, C.; HERMAN, V. Frequency of isolation and antibiotic resistance of staphylococcal flora from external otitis of dogs. **Veterinary Record**. 173(2), 42.2-42, 2013.

EBRAHIMY, F.; DOLATIAN, M.; MOATAR, F.; MAJD, H.A. Comparison of the therapeutic effects of Garcin® and fluconazole on *Candida vaginitis*. **Singapore Medical Journal**. 56 (10), 567-572, 2015.

FONTOURA, Eduardo Garcia. **Rosmarinus officinalis L. e Triticum aestivum no tratamento da otite externa infecciosa**. 2014. 50f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Veterinária, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

FRATIANNI, F.; RICCARDI, R.; SPIGNO, P.; OMBRA, M.N.; COZZOLINO, A.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R.; NAZZARO, F. Biochemical characterization and antimicrobial and antifungal activity of two endemic varieties of garlic (*Allium sativum* L.) of the campania region, southern Italy. **Journal Of Medicinal Food**. 19(7), 686-691, 2016.

GOMAA, N.F.; HASHISH, M.H. The inhibitory effect of garlic (*Allium sativum*) on growth of some microorganisms. **The Journal of the Egyptian Public Health Association**. 78(5-6), 361-72, 2003.

GÓMEZ, L.J.G.; SÁNCHEZ-MUNIZ, F.J. Revisión: Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**. 50(3), 219-229, 2000.

GROPPO, F.C.; RAMACCIATO, J.C.; SIMÕES, R.P.; FLÓRIO, F.M.; SARTORATTO, A. Antimicrobial activity of garlic, tea tree oil, and chlorhexidine against oral microorganisms. **International Dental Journal**. 52(6), 433-437, 2002.

GROPPO, F.C.; RAMACCIATO, J.C.; MOTTA, R.H.L.; FERRARESI, P.M.; SARTORATTO, A. Antimicrobial activity of garlic against oral streptococci. **International Journal of Dental Hygiene**. 5(2), 109-115, 2007.

GROSSO, E.S.B.; LIMA, A.P.L.; FERREIRA, G.; ANDRADE, M.C.; OLIVEIRA, M.A. Efeito antimicrobiano do alho (*Allium sativum*) sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isoladas de pacientes de um hospital escola do sul de Minas. **Anais do Conic-semesp**, Campinas, 1(3), p.1-1, 2013.

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

IWALOKUN, B.A.; OGUNLEDUN, A.; OGBOLU, D.O.; BAMIRO, S.B.; JIMI-OMOJOLA, J. *In vitro* antimicrobial properties of aqueous garlic extract against multidrug-resistant bacteria and *Candida* species from Nigeria. **Journal Of Medicinal Food**. 7(3), 327-333, 2004.

LANZOTTI, V.; SCALA, F.; BONANOMI, G. Compounds from *Allium* species with cytotoxic and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**. 13(4), 769-791, 2014.

LIMA, C.B.; RENTSCHLER, L.L.A.; BUENO, J.T.; BOAVENTURA, A.C. Plant extracts and essential oils on the control of *Alternaria alternata*, *Alternaria dauci* and on the germination and emergence of carrot seeds (*Daucus carota* L.). **Ciência Rural**. 46(5), 764-770, 2016.

MALCHER, J.C.R.; OLIVEIRA, E.L.; CASTRO, L.R.S.; SILVA, P.B.; RAMOS, E.L.M.; FERNANDES J.I. Eficácia do nim (*Azadirachta indica*) no tratamento de otite externa por *Malassezia* sp. em cães. **Revista Brasileira de Medicina Veterinária**. 34(1), 89-94, 2012.

MENDOZA-JUACHE, A.; ARANDA-ROMO, S.; BERMEO-ESCALONA, J.R.; GÓMEZ-HERNÁNDEZ, A.; POZOS-GUILLÉN, A.; SÁNCHEZ-VARGAS, L.O. The essential oil of *Allium sativum* as an alternative agent against *Candida* isolated from dental prostheses. **Revista Iberoamericana de Micología**, [s.l.], v. 34, n. 3, p.158-164, jul. 2017.

MURPHY, K.M. A review of techniques for the investigation of otitis externa and otitis media. **Clinical Techniques In Small Animal Practice**. 16(4), 236-241, 2001.

NOBRE, M. O; MEIRELES, M. C. A; GASPAR, L. F; PEREIRA, D; SCHRAMM, R; SCHUCH, L. F; SOUZA, L; SOUZAZ, L. *Malassezia pachydermatis* e outros agentes infecciosos nas otites externas e dermatites em cães. **Ciência rural**. 20(3), 447-452, 1998.

NOGUEIRA, J. C. R.; DINIZ, M. F. M.; LIMA, E. O. Atividade antimicrobiana in vitro de produtos vegetais em otite externa aguda. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, 74(1), 118-24, 2008.

OZAKI, A.T.; DUARTE, P.C. Fitoterápicos utilizados na medicina veterinária em cães e gatos. **Infarma**. 18(11/12), 17-25, 2006.

PATEL, A.; FORSYTHE, P. Otite externa e otite média em cão. In: _____. **Dermatologia em pequenos animais: Série clínica veterinária na prática**. Rio de Janeiro: Elsevier. p. 322-330, 2010.

PENNA, B.; VARGES, R.; MADEIROS, L.; MARTINS, G.M.; MARTINS, R.R.; LILENBAUM, W. Species distribution and antimicrobial susceptibility of staphylococci isolated from canine otitis externa. **Veterinary Dermatology**. 21(3), 292-296, 2009.

QUINTAES, K.D. Alho, nutrição e saúde. **Revista NutriWeb**, v.3, 2001. Disponível em: <<http://www.nutriweb.org.br/n0302/alho.htm>>. Acessado em: 02 de maio de 2016.

RODRIGUES, M.M.; SANTOS, S.S.F.; CLARO, C.A.A.; SCHERMA, A.P. Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica do *Allium sativum* sobre cepas de *Candida albicans* isoladas de cavidade bucal. **Periodontia**. 19(2), 124-132, 2009.

ROSSER, E.J. Causes of otitis externa. **Veterinary Clinics of North America: Small Animal Practice**. 34(2), 459-468, 2004.

ROSYCHUK, R.A.W.; LUTTGEN, P. Doenças dos ouvidos. In: ETTINGER, S.J.; FELDMAN, E.C. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**. 5. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1042-1059, 2004.

SANAD, R.A.; MABROUK, M.I. Development and assessment of stable formulations containing two herbal antimicrobials: *Allium sativum* L. and *Eruca sativa* miller seed oils. **Drug Development And Industrial Pharmacy**. 42(6), 958-968, 2015.

SANTIAGO, D.M.; FELÍCIO, V.P.T.; SOARES, S. Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro* do *Allium sativum* L. **Revista Mineira de Ciências da Saúde**. 3(1), 18-34, 2011.

SANTIN, R.; GIORDANI, C.; MADRID, I.M.; MATOS, C.B.; FREITAG, R.A.; MEIRELES, M.C.A.; CLEFF, M.B.; MELLO, J.R.B. Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* frente a *Malassezia pachydermatis*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**. 66(2), 367-373, 2014.

SANTOS, R.R. Sensibilidade *in vitro* da microbiota da orelha de cães com otite externa a cinco antimicrobianos. **Acta Scientiae Veterinariae**. 35(2), s433-s435, 2007.

SARKER, S.D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the *in vitro* antibacterial screening of phytochemicals. **Methods**. 42(4), 321-324, 2007.

SHAMS-GHAHFAROKHI, M., SHOKOOHAMIRI, M.R.; AMIRRAJAB, N.; MOGHADASI, B.; GHAJARI, A.; ZEINI, F.; SADEGHI, G.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. *In vitro* antifungal activities of *Allium cepa*, *Allium sativum* and ketoconazole against some pathogenic yeasts and dermatophytes. **Fitoterapia**. 77(4), 321-323, 2006.

SILVA, A.P.; SILVA, A.N.; SANTOS, A.B.; HARDOIM, E.L.; BATISTA, S.B. Atividade antibacteriana do alho (*Allium sativum* lineu) na forma de extrato aquoso e in natura sobre a cepa *Bacillus thuringiensis* berliner. **Revista Uniara**. 15(2), 59-67, 2012.

SILVA, E.Y.Y.; MORETTI, C.L.; MATTOS, L.M. Compostos funcionais presentes em bulbilhos de alhos armazenados sob refrigeração, provenientes de cultivos no Brasil e na China. **Ciência Rural**. 40(12), 2580-2587, 2010a.

SILVA, G.H.; SOUZA, P.F.; HENRIQUES, I.G.N.; CAMPELO, J.G.; ALVES, G.S. Extrato de alho e nim em diferentes concentrações com efeito fungicida em sementes de chorão (*Poecilanthe ulei*). **Revista Verde**. 5(4), 76-81, 2010b.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 1104p, 2010.

SNOWDEN, R.; HARRINGTON, H.; MORRILL, K.; JEANE, L.; GARRITY, J.; ORIAN, M.; LOPEZ, E.; REZAIE, S.; HASSBERGER, K.; FAMILONI, D.; MOORE, J.; VIRDEE, K.; ALBORNOZ-SANCHEZ, L.; WALKER, M.; CAVINS, J.; RUSSELL, T.; GUSE, E.; REKER, M.; TSCHUDY, O.; WOLF, J.; TRUE, T.; UKAEGBU, O.; AHAGHOTU, E.; JONES, A.; POLANCO, S.; ROCHON, Y.; WATERS, R.; LANGLAND, J. A Comparison of the anti-*Staphylococcus aureus* activity of extracts from commonly used medicinal plants. **The Journal of Alternative And Complementary Medicine**. 20(5), 375-382, 2014.

SOUZA, A.E.F.; ARAÚJO, E.; NASCIMENTO, L.C. Atividade antifúngica de extratos de alho e capim-santo sobre o desenvolvimento de *Fusarium proliferatum* isolado de grãos de milho. **Fitopatologia Brasileira**. 32(6), 465-471, 2007.

TEPE, B.; SOKMEN, M.; AKPULAT, H.A.; SOKMEN, A. *In vitro* antioxidant activities of the methanol extracts of five species from Turkey. **Food Chemistry**. 92(1), 89-92, 2005.

UCHIDA, Y.; TAKAHASHI, T.; SATO, N. The characteristics of the antibacterial activity of garlic. **The Japanese Journal of Antibiotics**. 28(4), 638-642, 1975.

VENÂNCIO, P.C.; FIGUEROBA, S.R.; NANI, B.D.; FERREIRA, L.E.N.; MUNIZ, B.V.; FIOL, F.S.; SARTORATTO, A.; ROSA, E.A.R.; GROppo, F.C. Antimicrobial activity of two garlic species (*Allium sativum* and *A. tuberosum*) against staphylococci infection. *In Vivo* study in rats. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**. 7(1), 115-121, 2017.

VINGOPOULOU, E.I.; SIARKOU, V.I.; BATZIAS, G.; KALTSOGIANNI, F.; SIANOU, E.; TZAVARAS, I.; KOUTINAS, A.; SARIDOMICHELAKIS, M.N.; SOFIANOU, D.; TZELEPI, E.; MIRIAGOU, V. Emergence and maintenance of multidrug-resistant *Escherichia coli* of canine origin harbouring a blaCMY-2-IncI1/ST65 plasmid and topoisomerase mutations. **Journal Of Antimicrobial Chemotherapy**. 69(8), 2076-2080, 2014.

WERNER, A.H. Otite externa e otite média. *In*: RHODES, K.H. **Dermatologia de pequenos animais: consulta em 5 minutos**. Rio de Janeiro: Revinter, p.144-151, 2005.

YAMADA, Y.; AZUMA, K. Evaluation of the *in vitro* antifungal activity of allicin. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. 11(4), 743-749, 1977.

ZIECH, R.E.; FARIAS, L.D.; BALZAN, C.; ZIECH, M.F.; HEINZMANN, B.M.; LAMEIRA, O.A.; VARGAS, A.C. Atividade antimicrobiana do oleoresina de copaíba (*Copaifera reticulata*) frente a *Staphylococcus coagulase positiva* isolados de casos de otite em cães. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. 33(7), 909-913, 2013.

ZUR, G.; GUREVICH, B.; ELAD, D. Prior antimicrobial use as a risk factor for resistance in selected *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from the skin and ears of dogs. **Veterinary Dermatology**. 27(6), 468-e125, 2016.

6 ANEXOS

Certificado



INSTITUTO FEDERAL
Catarinense
Campus Concórdia



REPÚBLICA FEDERATIVA DO BRASIL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO

Certificamos que o trabalho intitulado **"Avaliação da atividade antimicrobiana do alho (allium sativum) sobre microrganismos isolados de casos de otite externa em cães , apresentado por Juliana Grandi, foi classificado como DESTAQUE na Modalidade Comunicação Oral - Área das Ciências Agrárias, na VII Mostra de Iniciação Científica, realizada em 20 e 21 de setembro de 2017, no Instituto Federal Catarinense - Campus Concórdia.**

Concórdia, 25 de setembro de 2017.



Nelson Geraldo Golinski
Diretor-Geral
Portaria. Nº 288, D.O.U. de 27/01/2016



VII MIC
MOSTRA DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

INSTITUTO FEDERAL CATARINENSE - CAMPUS CONCORDIA
Registrado sob Nº 17986 Livro: 005 Folhas 85 expedido em 25/09/2017