

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA

**U LISBOA**

UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ESTRATÉGIAS ANTIMICROBIANAS INOVADORAS PARA  
CONTROLO DE OTITES EXTERNAS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NO CÃO

ANA FILIPA MOURÃO SOUSA

ORIENTADORA:

Doutora Maria Manuela  
Castilho Monteiro de Oliveira

COORIENTADORA:

Doutora Ana Mafalda Gonçalves  
Xavier Félix Lourenço

2021

UNIVERSIDADE DE LISBOA  
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA



UNIVERSIDADE  
DE LISBOA



AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ESTRATÉGIAS ANTIMICROBIANAS INOVADORAS PARA  
CONTROLO DE OTITES EXTERNAS POR *PSEUDOMONAS AERUGINOSA* NO CÃO

ANA FILIPA MOURÃO SOUSA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA VETERINÁRIA

JÚRI

PRESIDENTE:

Doutor José Henrique Duarte  
Correia

ORIENTADORA: Doutora Maria

Manuela Castilho Monteiro de Oliveira

VOGAIS:

Doutora Maria Manuela Castilho  
Monteiro de Oliveira

COORIENTADORA: Doutora Ana

Mafalda Gonçalves Xavier Félix Lourenço

Doutor Frederico Nuno

Castanheira Aires da Silva

2021

## DECLARAÇÃO RELATIVA ÀS CONDIÇÕES DE REPRODUÇÃO DA DISSERTAÇÃO

Nome: Ana Filipa Mourão Sousa

Título da Tese ou Dissertação: Avaliação *in vitro* de estratégias antimicrobianas inovadoras para controlo de otites externas por *Pseudomonas aeruginosa*

Ano de conclusão (indicar o da data da realização das provas públicas): 2021

Designação do curso de Mestrado ou de Doutoramento: Mestrado Integrado em Medicina Veterinária

Área científica em que melhor se enquadra (assinale uma):

- Função
- Clínica  Produção Animal e Segurança Alimentar
- Morfologia e  Sanidade Animal

Declaro sobre compromisso de honra que a tese ou dissertação agora entregue corresponde à que foi aprovada pelo júri constituído pela Faculdade de Medicina Veterinária da ULISBOA.

Declaro que concedo à Faculdade de Medicina Veterinária e aos seus agentes uma licença não-exclusiva para arquivar e tornar acessível, nomeadamente através do seu repositório institucional, nas condições abaixo indicadas, a minha tese ou dissertação, no todo ou em parte, em suporte digital.

Declaro que autorizo a Faculdade de Medicina Veterinária a arquivar mais de uma cópia da tese ou dissertação e a, sem alterar o seu conteúdo, converter o documento entregue, para qualquer formato de ficheiro, meio ou suporte, para efeitos de preservação e acesso.

Retenho todos os direitos de autor relativos à tese ou dissertação, e o direito de a usar em trabalhos futuros (como artigos ou livros).

Concordo que a minha tese ou dissertação seja colocada no repositório da Faculdade de Medicina Veterinária com o seguinte estatuto (assinale um):

- Disponibilização imediata do conjunto do trabalho para acesso mundial;
- Disponibilização do conjunto do trabalho para acesso exclusivo na Faculdade de Medicina Veterinária durante o período de  6 meses,  12 meses, sendo que após o tempo assinalado autorizo o acesso mundial\*;

\* Indique o motivo do embargo (OBRIGATÓRIO)

Nos exemplares das dissertações de mestrado ou teses de doutoramento entregues para a prestação de provas na Universidade e dos quais é obrigatoriamente enviado um exemplar para depósito na Biblioteca da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa deve constar uma das seguintes declarações (incluir apenas uma das três):

- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO INTEGRAL DESTA TESE/TRABALHO APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- É AUTORIZADA A REPRODUÇÃO PARCIAL DESTA TESE/TRABALHO (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) APENAS PARA EFEITOS DE INVESTIGAÇÃO, MEDIANTE DECLARAÇÃO ESCRITA DO INTERESSADO, QUE A TAL SE COMPROMETE.
- DE ACORDO COM A LEGISLAÇÃO EM VIGOR, (indicar, caso tal seja necessário, nº máximo de páginas, ilustrações, gráficos, etc.) NÃO É PERMITIDA A REPRODUÇÃO DE QUALQUER PARTE DESTA TESE/TRABALHO.

Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa, 17 de Dezembro de 2021

Assinatura: \_\_\_\_\_

Ana Sousa

## **Agradecimentos**

À Professora Manuela o meu agradecimento por ter aceite ser minha Orientadora e por todos os conhecimentos partilhados. Obrigada por toda a disponibilidade, entrega e dedicação neste trabalho. Sempre me recebeu com um sorriso e conseguiu acalmar com a sua visão prática e objetiva.

À Professora Mafalda por aceitar ser minha coorientadora, por me ter disponibilizado e ajudado a pesquisar bibliografia adequada e pelo conhecimento que consegue transmitir em cada conversa.

À Eva pelo seu positivismo contagiante, por ter sempre uma palavra de motivação a dizer, por ter acreditado em mim nos dias em que eu não consegui. Muito obrigada por toda a ajuda ao longo deste trabalho, sem ti não teria sido possível.

À restante equipa do Laboratório, especialmente à Carla, ao Miguel e à Sandra, pela boa disposição, pelos momentos e conversas passadas entre placas e meios de cultura, e por toda a ajuda ao longo do meu estágio.

À avó Lucinda e ao avô Sousa pelas comidinhas boas e por terem sempre a porta aberta para mim. À avó Lai, também pelas comidinhas, especialmente os lanches, e pelas conversas com conselhos de vida. Ao avô Mourão pela boa disposição e pelos bonitos poemas que escreve para nós. Sou sortuda por vos ter a todos a acompanhar e apoiar o meu percurso.

À minha Mãe, melhor amiga, confidente e abraço incondicional a todas as horas. Por sempre me apoiar em tudo.

Ao meu Pai por me ter ajudado a cumprir este sonho.

Ao meu irmão Kiko, felizmente a maturidade e o tempo mostraram-nos que somos mais parecidos do que pensámos, tenho orgulho em ti.

Ao perfeccionismo da Catarina, ao lirismo da Mafalda, ao lado pragmático da Sofia, colegas de curso que viraram amigas para a vida, sem vocês este caminho não teria sido o mesmo.

Ao Xavier, que para além de colega e amigo foi o melhor companheiro de casa que poderia imaginar. Adorei os 3 anos que vivemos juntos, vou guardar isso para sempre com muito carinho e bastantes saudades. Foram várias fases de vida, várias épocas de exames, refeições, longas conversas, muitos cafés à janela e danças só porque sim. Obrigada.

Ao Paulo por cuidar de mim há tanto tempo e me pôr “às direitas” nos meus momentos mais tortos. Espero um dia conseguir retribuir o que fez por mim.

À Dra. Marta que me abriu a porta da sua clínica e muito me ensinou ao longo destes anos que já passaram, espero continuar a aprender e evoluir consigo nos próximos que se seguem. Obrigada pela amizade e por acreditar em mim.

Aos meninos, Tsinho (Elvis), Dininho (Charlie), Dim Dim (Oliver) e Nininha (Ava).

Ao Júlio, pelo apoio incondicional. Contigo a vida é mais cheia, mais intensa e mais especial. Obrigada por sempre me mostrares o outro lado, mais simples.

## Resumo

### **Avaliação *in vitro* de estratégias antimicrobianas inovadoras para controlo de otites externas por *Pseudomonas aeruginosa* no cão**

O desenvolvimento e disseminação de microrganismos resistentes a antimicrobianos causados pelo uso inadequado desses compostos é uma grande preocupação de saúde pública, pressionando para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas.

A otite externa (OE) é uma das doenças dermatológicas mais comumente diagnosticadas em cães, tendo uma etiologia multifatorial. Entre os agentes bacterianos mais frequentemente associados à OE canina, *Pseudomonas aeruginosa* é de especial preocupação, devido ao seu frequente perfil de multirresistências e notável capacidade de formar biofilmes, estruturas que tornam os tratamentos desafiadores e propiciam para a cronicidade e recorrência das infeções. O aumento da prevalência de resistência antimicrobiana entre bactérias em cães com OE leva à necessidade de se encontrar novos agentes terapêuticos, incluindo o uso de óleos essenciais ou géis contendo péptidos antimicrobianos, como o Peptivet®.

O objetivo principal deste estudo foi comparar a eficácia de diferentes antimicrobianos no controlo da OE canina de *P. aeruginosa*, incluindo Gentamicina, um antibiótico convencional, e Peptivet® e Óleo Essencial de Lavanda (OEL), duas estratégias antimicrobianas inovadoras. O outro objetivo foi avaliar o impacto do cerúmen canino na atividade inibitória do Peptivet® com o objetivo de avaliar se esta é mantida em condições que melhor mimetizem as OE *in vivo*, dado que o cerúmen e o conteúdo lipídico, que estão alterados na OE, podem influenciar a penetração e ação de compostos antimicrobianos.

Dos antimicrobianos avaliados, o OEL apresentou a maior eficácia após 30 minutos de incubação, demonstrando capacidade de inibir e erradicar os biofilmes formados por 61,5% dos isolados em estudo, e a Gentamicina apresentou a maior eficácia após 24 horas de incubação, demonstrando capacidade para inibir e erradicar biofilmes formados por 100% dos isolados em estudo. O Peptivet® apresentou a menor eficácia, tendo sido aproximadamente metade da eficácia do OEL após 30 minutos de incubação.

Os resultados deste estudo indicam que o Óleo Essencial de Lavanda avaliado pode ser considerado uma alternativa inovadora com grande potencial para o tratamento e prevenção da OE causada por *P. aeruginosa* em cães, sugerindo a necessidade de continuar esta linha de investigação com o objetivo da sua utilização futura em contexto clínico.

**Palavras-chave:** Otite Externa; *Pseudomonas aeruginosa*; Gentamicina; Óleo Essencial de Lavanda; Peptivet®

## Abstract

### ***In vitro* evaluation of innovative antimicrobial approaches aiming at controlling otitis by *Pseudomonas aeruginosa* in dogs**

The development and spread of antimicrobial resistant microorganisms caused by the inappropriate use of these compounds is a major public health concern, pressing for the development of new therapeutic strategies.

Otitis externa (OE) is one of the most commonly diagnosed dermatological diseases in dogs, having a multifactorial etiology. Among the most frequent bacterial agents associated with canine OE, *Pseudomonas aeruginosa* is of special concern, due to its frequent multidrug resistance profile and its remarkable ability to form biofilms, structures that make treatments challenging and predispose to the chronicity and recurrence of infections. The increasing prevalence of antimicrobial resistance among bacteria in dogs with OE leads to the need to find new therapeutic agents including the use of Essential Oils or gels containing antimicrobial peptides, such as Peptivet®.

The main objective of this study was to compare the antimicrobial potential of different antimicrobials to control *P. aeruginosa* canine OE, including Gentamicin, a conventional antibiotic, and Peptivet® and Lavanda Essential Oil (OEL), two innovative antimicrobial strategies. The other objective was to assess the impact of canine cerumen on the inhibitory activity of Peptivet®, aiming at evaluating if its inhibitory potential is maintained in conditions which better mimic the ears *in vivo* environment, since the skin cerumen and lipid content, which are altered in ears with otitis, may influence the penetration and action of antimicrobial compounds.

Of the antimicrobials evaluated, the ones that showed the best effectiveness were Lavender Essential Oil after 30 minutes incubation, which demonstrated the ability to inhibit and eradicate the biofilms formed by 61.5% of the isolates under study, and Gentamicin after 24 hours incubation, which demonstrated the ability to inhibit and eradicate biofilms formed by 100% of the isolates under study. Peptivet® had the lowest effectiveness, having approximately half the effectiveness of the oil after 30 minutes of incubation.

The results of this study indicate that the evaluated Lavender Essential Oil can be considered an innovative alternative with great potential for the treatment and prevention of external otitis caused by *P. aeruginosa* in dogs, suggesting the need to continue this line of research in terms of its future use in a clinical context.

**Keywords:** Otitis Externa; *Pseudomonas aeruginosa*; Gentamicin; Essential Oils; Peptivet®

## Índice Geral

AGRADECIMENTOS .....	III
RESUMO .....	V
ABSTRACT .....	VI
ÍNDICE DE FIGURAS .....	IX
ÍNDICE DE TABELAS .....	IX
ÍNDICE DE GRÁFICOS.....	X
LISTA DE ABREVIATURAS.....	XI
PARTE 1 – RELATÓRIO DE ESTÁGIO .....	1
PARTE 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	3
<b>1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>.....</b>	<b>3</b>
1.1. Caraterísticas gerais .....	3
1.2. Fatores de virulência de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	4
1.3. Mecanismos de Resistência .....	5
1.3.1. Resistência Intrínseca .....	5
1.3.1.1. Permeabilidade da membrana externa.....	6
1.3.1.2. Bombas de efluxo.....	6
1.3.1.3. Mecanismos enzimáticos que alteram os compostos antimicrobianos.....	6
1.3.2. Resistência Adquirida.....	7
1.3.3. Resistência Adaptativa.....	8
1.3.3.1. Biofilme .....	8
<b>2. Abordagem clínica da otite externa por <i>Pseudomonas aeruginosa</i> em cães.....</b>	<b>9</b>
2.1. Considerações sobre a anatomia do ouvido externo do cão .....	9
2.2. Microambiente do conduto auditivo externo.....	10
2.3. A Otite Externa.....	12
2.4. A relevância da citologia auricular no diagnóstico de Otite Externa .....	14
2.5. O papel da cultura e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) .....	15
2.6. Tratamento .....	15
<b>3. Estratégias microbianas inovadoras.....</b>	<b>17</b>
3.1. Contexto Atual .....	17
3.2. Algumas propostas inovadoras no combate a infecções por <i>P. aeruginosa</i> .....	20
3.2.1. Óleos essenciais .....	21
3.2.2. Péptidos Antimicrobianos .....	23
PARTE III – DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL.....	28
<b>1. Objetivos e fases experimentais .....</b>	<b>28</b>
<b>2. Materiais e métodos .....</b>	<b>28</b>



2.1.	Isolados bacterianos .....	28
2.2.	Avaliação da capacidade de formação de biofilme pelos isolados em estudo .....	29
2.3.	Preparação de uma solução stock de Gentamicina .....	30
2.4.	Preparação da solução de lavagem de Tris-EDTA e clorhexidina .....	30
2.5.	Peptivet® .....	30
2.6.	Óleo essencial de Lavanda (OEL).....	31
2.7.	Comparação do potencial antimicrobiano da Gentamicina, Peptivet® e Óleo de Lavanda utilizando um modelo <i>in vitro</i> de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> .....	31
2.8.	Estabelecimento de um modelo <i>in vitro</i> de cerúmen de cão e avaliação seu do impacto na atividade antimicrobiana do Peptivet® relativamente a biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> .....	35
<b>3.</b>	<b>Resultados e Discussão.....</b>	<b>36</b>
3.1	Avaliação da capacidade de formação de biofilme pelos isolados de <i>P. aeruginosa</i> em estudo 37	
3.2	Comparação do potencial antimicrobiano da Gentamicina, Peptivet® e Óleo de Lavanda utilizando um modelo <i>in vitro</i> de biofilme de <i>P. aeruginosa</i> - avaliação da capacidade inibitória (CIB) e de erradicação (CEB) de biofilme .....	41
3.3	Estabelecimento de um modelo <i>in vitro</i> de cerúmen de cão e avaliação do seu impacto na atividade antimicrobiana do Peptivet® relativamente a biofilmes de <i>P. aeruginosa</i> .....	48
<b>4</b>	<b>Conclusões .....</b>	<b>51</b>
<b>5</b>	<b>Limitações do estudo .....</b>	<b>51</b>
<b>6</b>	<b>Perspetivas futuras.....</b>	<b>52</b>
	<b>BIBLIOGRAFIA .....</b>	<b>53</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>62</b>

## Índice de Figuras

Figura 1 - Esquema da formação do biofilme (original do autor) .....	9
Figura 2 - Otite supurativa associada a infeção por <i>P. aeruginosa</i> (gentilmente cedida pela Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço) .....	14
Figura 3 - Esquema do péptido AMP2041 (iCF 2016) .....	26
Figura 4 – Formação de poros (círculos a amarelo) nas membranas celulares pelo AMP2041 (iCF 2016) .....	26
Figura 5 - Avaliação microscópica de um dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> em estudo após coloração de Gram (original do autor) .....	29
Figura 6 - Controlos utilizados no ensaio (original do autor).....	30
Figura 7 - Esquema representativo da distribuição das suspensões bacterianas numa microplaca de 96 poços (original do autor).....	32
Figura 8 - Esquema representativo da distribuição das suspensões bacterianas numa microplaca de 96 poços (original do autor).....	32
Figura 9 - Biofilme formado na microplaca após 72 horas de incubação a 37°C (original do autor).....	33
Figura 10 - Esquema representativo de uma microplaca para determinação da CIB e CEB da Gentamicina (original do autor) .....	33
Figura 11 - Esquema representativo de uma microplaca para determinação da CIB e CEB do Peptivet® e Óleo de Lavanda (original do autor) .....	34
Figura 12 - Esquema representativo de uma microplaca para determinação da CIB e CEB do cerúmen+Peptivet® (original do autor).....	35
Figura 13 - Placa de Agar Vermelho de Congo inoculada com isolados de <i>P. aeruginosa</i> positivos para a formação de biofilme (original do autor) .....	38
Figura 14 – Resultados do ensaio para avaliação da CEB da Gentamicina após incubação durante 30 minutos, onde se observa a multiplicação dos isolados 2, 4, 6, 8, 11 e 12 após incubação com este composto antimicrobiano (original do autor).....	43
Figura 15 – Resultados do ensaio para avaliação da CEB da Gentamicina após incubação durante 24 horas, onde se observa que todos os isolados foram erradicados após a incubação com este composto antimicrobiano (original do autor).....	43
Figura 16 - Halo de inibição promovido pelos triglicéridos num tapete bacteriano produzido por um dos isolados de <i>P. aeruginosa</i> (original do autor) .....	50

## Índice de Tabelas

Tabela 1 - Características do péptido AMP2041 (iCF 2016) .....	26
--	----

Tabela 2 - Resultados do ensaio de avaliação da capacidade de formação de biofilme pelos isolados de <i>P. aeruginosa</i> em estudo.....	40
Tabela 3 - Avaliação da capacidade de inibição e de erradicação dos compostos antimicrobianos em estudo após 30 minutos de incubação .....	42
Tabela 4 - Avaliação da capacidade de inibição e de erradicação dos compostos antimicrobianos em estudo após 24 horas de incubação.....	44
Tabela 5 - Eficácia média apresentada pelos compostos antimicrobianos em estudo após 30 minutos e 24 horas de incubação .....	44
Tabela 6 - Perfil de resistência à Gentamicina dos isolados em estudo.....	48

### **Índice de Gráficos**

Gráfico 1 - Percentagem da capacidade de formação de biofilme pelos isolados ....	39
---	----

### **Índice de Anexos**

Anexo 1 - Perfil de resistências dos isolados utilizados no estudo e respetivo ano de recolha .....	62
---	----

## Lista de Abreviaturas

°C – Grau centígrado

% - Percentagem

® - Marca registada

µL – Microlitro

**ADN** – Ácido desoxirribonucleico

**AHL** – Acetil-homoserina-lactona

**AME** – Enzimas modificadoras de amido

**AMPs** – “Antimicrobial Peptides”

**BHI** – “Brain Heart Infusion”

**CAD** – Cinamaldeído

**CAE** – Conduto auditivo externo

**CEB** – Concentração de erradicação de biofilme

**CIB** – Concentração de inibição de biofilme

**COS** – “Columbia Blood Agar”

**CMB** – Concentração mínima bactericida

**CMI** – Concentração mínima inibitória

**CP** – Célula persistente

**EUCAST** – “European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing”

**EPS** – Substância extracelular polimérica

**ESKAPE** – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter spp.*

**FAO** – Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura

**FQ** – Fluoroquinolonas

**HR** – Humidade relativa

**Hz** – Hertz

**ITU** – Infecção do trato urinário

**IU** – Unidades internacionais

**LAMP** – “Linking Antimicrobial Peptides”

**LPS** - Lipopolissacárido

**MAE** – Meato acústico externo

**MDR** – Multirresistente

**MRSA** – *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina

**NaCl** – Cloreto de sódio

**OE** – Otite externa

**OEL** – Óleo Essencial de Lavanda

**PN** – Produto Natural

**QS** – “Quorum Sensing”

**RND** – “Resistance-nodulation-division”

**T3SS** – “Type 3 secretion system”

**Tris-EDTA** - Trometamina com ácido etilenodiaminotetracético

**TSA** – Teste de suscetibilidade aos antimicrobianos

**TSB** – “Tryptic soy broth”

**UFC** – Unidade formadora de colónia

**VRE** – *Enterococos* resistente à Vancomicina

## PARTE 1 – RELATÓRIO DE ESTÁGIO

O meu estágio curricular foi realizado no período de 15 de Setembro 2019 a 15 de Março de 2020 no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Sanidade Animal da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa (FMV-ULisboa). Durante este período desenvolvi trabalho laboratorial que me permitiu construir a minha dissertação de mestrado, sendo que parte deste estudo foi financiada através de um Projeto CIISA MSc 2020 com o título “*In vitro* evaluation of innovative antimicrobial approaches aiming at controlling otitis by *Pseudomonas aeruginosa* in dogs”.

No primeiro dia de trabalho laboratorial foram-me apresentadas todas as regras de desinfeção, assepsia e proteção pessoal necessárias à prática de técnicas laboratoriais de forma segura e responsável para mim e para os restantes colegas.

Nas primeiras semanas de estágio foi realizada uma pesquisa bibliográfica sobre os isolados que iriam ser incluídos no estudo e foram executadas técnicas básicas de laboratório, incluindo a propagação em meio de cultura dos isolados selecionados para o estudo seguida de coloração por método Gram, respetiva caracterização morfológica das estirpes e posteriormente caracterização quanto à capacidade de formação de biofilmes. Ao mesmo tempo foram realizadas diversas tarefas relacionadas com as atividades de rotina de quem trabalha num laboratório, como preparação de meios de cultura e soluções necessárias ao estudo e preparação do material para esterilização.

Antes de cada etapa do estudo era elaborada uma pesquisa bibliográfica que permitia o estabelecimento dos protocolos experimentais a realizar nos passos seguintes.

Durante estes meses foram adquiridos conhecimentos relativamente a técnicas laboratoriais, tais como propagação de estirpes em meios de cultura, obtenção de uma suspensão bacteriana com determinado grau de turvação na escala de MacFarland, técnicas de pipetagem e estabelecimento de um modelo *in vitro* de biofilme de *Pseudomonas aeruginosa*.

Foi também adquirida experiência no manuseamento de vários instrumentos e equipamentos de laboratório, como a pipeta multicanal, a pipeta graduada, o bico de Bunsen, e o microscópio óptico e o banho de ultrassons.

Apesar de, para este estudo, terem sido utilizados isolados clínicos pertencentes à coleção do Laboratório de Bacteriologia previamente caracterizados, foram praticados todos os passos necessários à caracterização de isolados obtidos a partir de amostras clínicas de conduto auditivo de cão, incluindo a realização de testes de suscetibilidade aos antimicrobianos, que complementaram os meus conhecimentos clínicos sobre otites externas no cão.

Por fim, fiz parte de uma equipa que teve sempre a maior disponibilidade em partilhar e ensinar toda a experiência e conhecimentos que têm nesta área da microbiologia e bacteriologia e que me prepararam e motivaram para realizar o meu trabalho laboratorial de forma autónoma, organizada e responsável.

## PARTE 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 1. *Pseudomonas aeruginosa*

#### 1.1. Características gerais

A bactéria atualmente conhecida como *Pseudomonas aeruginosa* (antigo *Bacillus pyocyaneus*) já apresentou diferentes nomenclaturas ao longo do tempo, sempre atribuídas com base na distinta coloração azul-esverdeada das suas colônias (Villavicencio 1998; Lister et al. 2009).

*Pseudomonas aeruginosa* é uma bactéria em forma de bastonete, de Gram-negativo, oxidase positiva, não fermentadora de lactose, pertencente à família *Pseudomonadaceae* (Lin et al. 2012; Murray et al. 2010; Alhazmi 2015). Tem uma ampla distribuição na natureza, sendo um microrganismo ubiqüitário frequentemente encontrado no solo e na água (Gellatly and Hancock 2013; Serrano et al. 2017). Dado que é um agente patogénico oportunista, tanto para o Homem como para os animais, é uma causa frequente de infeções nosocomiais, principalmente em pacientes imunodeprimidos (Cabassi et al. 2017). Em medicina veterinária, encontra-se frequentemente associada a casos crónicos de otite externa e média, piodermites profundas e infeções do trato urinário no cão, mastite em bovinos e dermatite no coelho (Serrano et al. 2017).

As culturas de *P. aeruginosa* em meios sólidos apresentam dois tipos principais de morfologia: colônias grandes com margens lisas e centro elevado (tipo “ovo estrelado”) e colônias pequenas, rugosas e convexas. É frequente possuírem um brilho metálico e apresentarem um odor frutado característico, resultante da produção de trimetilamina. Este microrganismo não se consegue multiplicar em ambientes ácidos com pH inferior a 4,5, e, apesar de apresentar uma taxa de multiplicação ótima a 37°C, tem a capacidade de se multiplicar a 42°C, o que distingue *P. aeruginosa* das outras espécies pertencentes ao mesmo género (Murray et al. 2010).

Um estudo realizado por Serrano et al. (2017) mostrou a semelhança entre o genoma de isolados de *P. aeruginosa* presentes no meio ambiente e isolados clínicos de animais e pessoas, não tendo sido possível identificar nenhum clone específico associado a uma determinada doença, habitat ou espécie animal. É uma bactéria notavelmente adaptável a diferentes ambientes, graças à flexibilidade dos seus requisitos nutricionais, à possibilidade de se multiplicar tanto em condições aeróbicas como anaeróbicas (Arai 2011) e também devido ao seu genoma extenso comparativamente a outras bactérias, proporcionando-lhe uma maior versatilidade metabólica (Serrano et al. 2017; Pang et al. 2019).

Para ser possível compreender o grande desafio terapêutico que as infeções por *P. aeruginosa* representam, é necessário conhecer os seus fatores de virulência e mecanismos de resistência aos antimicrobianos. É um microrganismo que consegue expressar vários



mecanismos de resistência, incluindo resistência intrínseca, adquirida e adaptativa que, por vezes, podem estar presentes simultaneamente no mesmo isolado. Os isolados de *P. aeruginosa* apresentam capacidade de facilmente adquirirem novos determinantes de resistência e, em consequência, a interação específica e delicada entre estes diferentes fatores pode culminar em falha terapêutica (Gellatly and Hancock 2013; Cabassi et al. 2017; Pang et al. 2019).

## **1.2. Fatores de virulência de *Pseudomonas aeruginosa***

As infecções provocadas por *P. aeruginosa* são um processo multifatorial influenciado em grande parte pela sua capacidade de expressão de uma ampla variedade de fatores de virulência. A alteração ou neutralização das defesas naturais do hospedeiro permitem uma eficiente aderência e colonização dos tecidos e, conseqüentemente, a invasão local ou disseminação sistêmica pelo sistema vascular (Alhazmi 2015).

Cada célula de *P. aeruginosa* possui um único flagelo localizado num dos seus polos e várias fímbrias. O flagelo é responsável pela mobilidade da célula bacteriana e as fímbrias permitem a aderência desta às células epiteliais do hospedeiro. Estes apêndices proteicos funcionam como meio de locomoção e ambos conseguem iniciar uma resposta inflamatória tendo também um papel importante na ligação, invasão e formação de biofilme (Gellatly and Hancock 2013; Alhazmi 2015).

O lipopolissacárido (LPS) é um constituinte da membrana externa presente em todas as bactérias de Gram-negativo, contribuindo para a sua integridade estrutural. É composto por dois domínios principais importantes: o lípido A (região hidrofóbica) e o polissacárido O (região hidrofílica). O LPS parece estar envolvido na disseminação sistêmica de *P. aeruginosa* e também na aderência aos tecidos do hospedeiro (Gellatly and Hancock 2013).

O lípido A é uma exotoxina que inibe a síntese proteica, levando à morte celular. Apresenta um potencial antigénico importante, desencadeando no hospedeiro processos inflamatórios locais e sistémicos graves, incluindo necrose de tecidos moles e choque séptico, interrupção da atividade celular e da resposta dos macrófagos (Alhazmi 2015; Sampath 2018).

A piocianina é um pigmento azulado produzido exclusivamente por *P. aeruginosa*, conferindo-lhe a sua cor característica. A piocianina consegue interferir no transporte mitocondrial de eletrões causando stress oxidativo ao hospedeiro, e inativa a ação da catalase nas células epiteliais (Gellatly and Hancock 2013). A pioverdina, outro pigmento produzido por *P. aeruginosa*, é um sideróforo capaz de sequestrar o ferro armazenado nas células hospedeiras. A quelação do ferro é uma parte vital no estabelecimento de infeções e na progressão para infeções crónicas. O meio do hospedeiro tem pouco ferro livre disponível devido à presença de moléculas sequestradoras, tais como a lactoferrina e a transferrina,

sendo que, ao capturar o ferro, a pioverdina permite uma vantagem competitiva às bactérias (Gellatly and Hancock 2013).

O “Quorum sensing” (QS) é um mecanismo de reconhecimento e comunicação celular que permite a adaptação coordenada de uma população bacteriana face às mudanças ambientais, através da regulação da expressão de vários genes. Em *P. aeruginosa*, esta adaptação é mediada por pequenas moléculas com capacidade de difusão livre através das membranas das bactérias sendo as acetil-homoserina-lactonas (AHLs) as mais comuns, (Alhazmi 2015). A expressão de muitos dos fatores de virulência de *P. aeruginosa*, incluindo a formação de biofilmes, é regulada por QS. É um importante mecanismo envolvido na formação e manutenção de biofilmes, pois permite reconhecer a densidade populacional bacteriana e as condições do meio em que as células se encontram, participando na ocorrência de alterações fenotípicas e genotípicas essenciais para garantir a sua sobrevivência (Song et al. 2019). Este mecanismo não causa danos ao hospedeiro diretamente, contudo oferece à bactéria uma vantagem seletiva sobre as defesas do hospedeiro e contribui para a sua patogenicidade, sobrevivência e disseminação (Gellatly and Hancock 2013).

### **1.3. Mecanismos de Resistência**

O sucesso das infeções bacterianas é determinado por vários fatores inter-relacionados, incluindo a capacidade adaptativa da bactéria, a sua patogenicidade, transmissibilidade e mecanismos de resistência aos antimicrobianos (Pang et al. 2019).

A resistência bacteriana pode ser definida como a capacidade das bactérias de resistir aos efeitos dos compostos antimicrobianos *in vitro*. Uma bactéria multiresistente (MDR) não é suscetível a pelo menos três compostos com mecanismos de ação diferentes. Para esta definição de multiresistência apenas é considerada a resistência adquirida, e a não-suscetibilidade é definida com base nos resultados de teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) *in vitro* que sejam resistentes, intermédios ou não-suscetíveis (Magiorakos et al. 2012).

Segundo Pang et al. (2019) os mecanismos de resistência mais relevantes de *P. aeruginosa* podem ser classificados em mecanismos intrínsecos, adquiridos e adaptativos.

#### **1.3.1. Resistência Intrínseca**

*P. aeruginosa* tem mecanismos de resistência intrínseca a muitos dos antimicrobianos disponíveis (Alhazmi 2015). Estes mecanismos referem-se à capacidade inata da bactéria para diminuir a eficácia de um antimicrobiano através de características funcionais ou estruturais a ela inerentes, ocorrendo sem a necessidade de uma exposição prévia ao antimicrobiano. O conhecimento da resistência intrínseca das diferentes espécies de bactérias pode ajudar a escolher as estratégias para o tratamento empírico (Pang et al. 2019).

### **1.3.1.1. Permeabilidade da membrana externa**

A maioria dos antimicrobianos utilizados para tratar infecções por *P. aeruginosa* têm de ser capazes de penetrar a membrana externa para alcançar alvos intracelulares.

A membrana externa de *P. aeruginosa* atua como uma barreira seletiva que previne a penetração dos antimicrobianos (Pang et al. 2019). As porinas são canais de difusão hidrofílicos localizados na membrana externa que permitem o influxo de pequenas moléculas. Em *P. aeruginosa*, a principal porina expressa é a OprF, a qual permite a entrada de diversos substratos e, por isso, é considerada inespecífica (Lister et al. 2009; Pang et al. 2019).

Em consequência de alterações estruturais, do número, da seletividade ou do tamanho das porinas, a permeabilidade da membrana diminui, contribuindo para a resistência da bactéria à entrada de um determinado conjunto de antimicrobianos. A permeabilidade da membrana celular é essencial para determinar a taxa de absorção dos antimicrobianos. Ao dificultar a sua penetração, está-se a limitar o efeito destas substâncias (Džidić et al. 2008).

### **1.3.1.2. Bombas de efluxo**

As bombas de efluxo existem naturalmente nas bactérias como uma forma de excretar substâncias derivadas do seu metabolismo. São sistemas localizados na membrana celular que constituem um conduto eficiente no transporte ativo de substâncias tóxicas para o meio extracelular (Džidić et al. 2008; Pang et al. 2019).

A capacidade de bombear compostos antimicrobianos para fora das células é a forma mais comum de resistência à maioria das classes de antimicrobianos. Em *P. aeruginosa*, o efluxo ativo é um importante mecanismo não enzimático de resistência aos  $\beta$ -lactâmicos (dos Santos et al. 2015). Algumas bombas podem ser induzidas por determinados substratos e a hiperexpressão destes sistemas numa estirpe aparentemente suscetível pode desencadear a diminuição da suscetibilidade aos antimicrobianos ou mesmo torná-la resistente. Diferentes transportadores reconhecem diferentes classes de antimicrobianos e quando expressos simultaneamente podem originar resistência cruzada (Ferreira 2010).

Em *P. aeruginosa* os sistemas de bombas de efluxo têm contribuído para o desenvolvimento de fenótipos de multirresistência às classes de antimicrobianos clinicamente mais relevantes: fluoroquinolonas,  $\beta$ -lactâmicos e aminoglicosídeos (Sun et al. 2014).

### **1.3.1.3. Mecanismos enzimáticos que alteram os compostos antimicrobianos**

A produção de enzimas que apresentam a capacidade de degradar ou modificar ligações químicas nos compostos antimicrobianos são também um dos mecanismos mais importantes de resistência intrínseca em *P. aeruginosa*. A inativação enzimática é o principal mecanismo de resistência das bactérias de Gram-negativo aos antibióticos  $\beta$ -lactâmicos. As

$\beta$ -lactamases são enzimas que degradam o anel  $\beta$ -lactâmico, presente nestes compostos, rompendo a ligação amida, de forma que os produtos obtidos deixam de possuir atividade antibacteriana. Estas enzimas localizam-se no espaço periplasmático e inativam os  $\beta$ -lactâmicos assim que estes atravessam a membrana externa e antes de atingirem o seu local de ação (Lister et al. 2009; Pang et al. 2019)

As diferentes  $\beta$ -lactamases apresentam diferentes alvos, e atualmente encontram-se descritos vários grupos e classes de  $\beta$ -lactamases. *P. aeruginosa* apresenta um número significativo de  $\beta$ -lactamases pertencentes a diferentes classes, incluindo penicilinasas, cefalosporinasas, cefamicinasas e carbapenemases (Pang et al. 2019).

A transferência de grupos químicos é outro mecanismo de inativação dos antibióticos no qual participam as enzimas modificadoras de aminoglicosídeos (AME). As AME alteram a estrutura química dos aminoglicosídeos através de reações de fosforilação, acetilação e adenilação, interferindo tanto no transporte do fármaco como na sua afinidade de ligação ao local alvo na célula bacteriana (subunidade ribossomal 30S) (Džidić et al. 2008; Blair et al. 2015).

### **1.3.2. Resistência Adquirida**

A resistência adquirida envolve uma mudança da composição genética do organismo através da ocorrência mutações ou da aquisição de ácido desoxirribonucleico (ADN) exógeno por transferência horizontal de genes (Gellatly and Hancock 2013; Pang et al. 2019)

As bactérias podem adquirir ADN exógeno através de bacteriófagos (transdução), da incorporação de fragmentos livres de ADN presentes no meio envolvente (transformação) ou da mobilização de plasmídeos após contacto direto célula-a-célula (conjugação), que constitui o mecanismo mais comum de transferência de genes de resistência (Džidić et al. 2008; Blair et al. 2015).

As mutações, induzidas ou espontâneas, são alterações permanentes na estrutura dos genes que podem ocorrer durante a replicação, podendo resultar em características vantajosas para a bactéria. As mutações podem ser responsáveis pela diminuição da entrada do antimicrobiano na célula através de alterações nas porinas, pela modificação dos seus alvos na célula ou por promover a hiperexpressão das bombas de efluxo e das enzimas inativadoras dos antimicrobianos, tais como as  $\beta$ -lactamases (Džidić et al. 2008; Gellatly and Hancock 2013). Se a mutação resultar num benefício para a bactéria, como no caso da resistência aos antimicrobianos, então tenderá a predominar naquela espécie após transmissão às gerações seguintes (Pang et al. 2019).

*P. aeruginosa* é capaz de expressar uma ampla variedade de mecanismos de resistência adquiridos, incluindo a produção de  $\beta$ -lactamases, principalmente devido a mutações em genes de resistência localizados no cromossoma ou pela aquisição de genes

de resistência de outra bactéria através de plasmídeos e integrões (Arais et al. 2016; Pang et al. 2019). Juntamente com a elevada resistência intrínseca a antimicrobianos apresentados pela espécie *P. aeruginosa*, a resistência adquirida contribui para o desenvolvimento de estirpes multirresistentes, o que aumenta a dificuldade em erradicar esta bactéria e leva a mais casos de infeções persistentes (Alhazmi 2015; Pang et al. 2019).

### **1.3.3. Resistência Adaptativa**

A resistência adaptativa possibilita um aumento da capacidade de sobrevivência da bactéria após contato com um antimicrobiano devido a alterações transitórias na expressão de um gene ou de uma proteína em resposta a estímulos ambientais, e pode ser reversível quando o estímulo é removido. Em *P. aeruginosa*, o mecanismo de resistência adaptativa melhor descrito é a formação de biofilmes (Pang et al. 2019).

#### **1.3.3.1. Biofilme**

Um biofilme é uma comunidade séssil de bactérias altamente organizada. Num biofilme, as diferentes bactérias que o constituem ligam-se umas às outras e aderem a uma superfície, estando envoltas numa matriz de substâncias extracelulares poliméricas (EPSs) por elas produzida. A matriz EPS perfaz a maioria do volume do biofilme e é composta por polissacáridos, proteínas, metabolitos e ADN extracelular (Pye et al. 2013).

A regulação da formação de biofilme por *P. aeruginosa* é multifatorial e depende maioritariamente da comunicação célula-célula promovida pelo sistema “Quorum sensing”, e também por variações e sinais do meio ambiente, tais como, o aumento de densidade celular e alterações mecânicas, nutricionais e metabólicas (Donlan 2002). A transição de *P. aeruginosa* do estado planctónico para biofilme envolve inúmeras alterações fisiológicas, sendo que a primeira fase consiste na adesão inicial reversível das células a uma superfície biótica ou abiótica. A capacidade de adesão de um microrganismo a uma superfície depende da presença de estruturas celulares como o pili, os flagelos e as fímbrias. Seguidamente a adesão da bactéria à superfície torna-se irreversível, formando-se microcolónias. Posteriormente, ocorre a diferenciação das microcolónias em macrocolónias envolvidas numa matriz de exopolissacáridos, formando biofilmes maduros. Por fim, pode ocorrer a descamação de algumas bactérias em estado planctónico ou microcolónias das camadas mais externas do biofilme maduro, que irão iniciar um novo processo de colonização numa nova superfície, funcionando como um foco de disseminação de microrganismos que contribuem para perpetuar infeções existentes (Donlan 2002; Pye et al. 2013; Alhazmi 2015).

Durante a formação do biofilme, ocorre a criação de canais internos que asseguram a propagação de nutrientes e oxigénio a células localizadas mais profundamente no biofilme

(Drenkard 2003). Quando completamente maduro, o biofilme funciona como uma associação funcional de células heterogêneas, com padrões de multiplicação distintos, cooperação fisiológica e eficiência metabólica. Nesta fase, as células localizadas em regiões diferentes do biofilme exibem diferentes padrões de expressão genética (Donlan 2002; Alhazmi 2015).

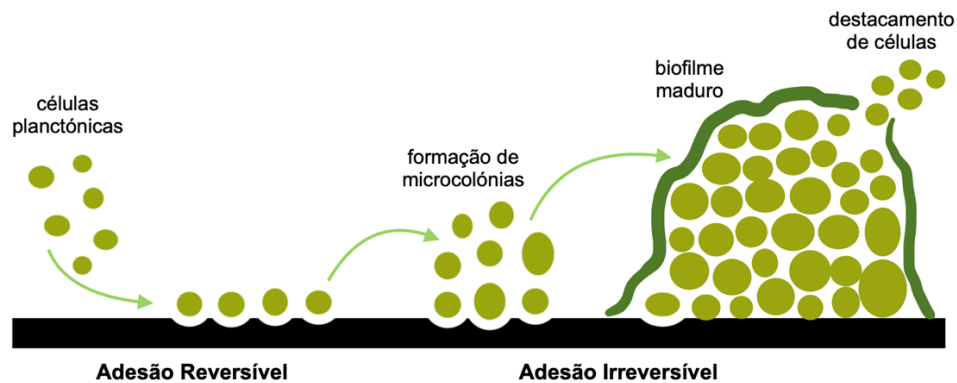


Figura 1 - Esquema da formação do biofilme (original do autor)

Os biofilmes são um problema importante em medicina humana e veterinária devido à sua resistência à penetração de antimicrobianos e desinfetantes. Dentro do biofilme as células bacterianas recebem proteção física adicional contra fatores externos, sendo menos suscetíveis a agentes antimicrobianos e à resposta imunitária do hospedeiro do que as que se multiplicam em modo planctônico (Nuttall 2016).

As células persistentes (CPs) compreendem uma pequena subpopulação de células dentro de um biofilme que espontaneamente conseguem entrar num estado metabólico quiescente, não apresentando divisão celular. Estas células exibem alta tolerância a antimicrobianos, o que significa que não se multiplicam na presença destes, mas também não morrem (Keren et al. 2004; Lewis 2010). Quando a antibioterapia é suspensa, as CPs retomam a sua capacidade de multiplicação e participam na recolonização do local da infeção, impedindo a sua erradicação (Grassi et al. 2017). De facto, Keren et al. (2004) sugeriu que a sobrevivência de um biofilme após antibioterapia também poderá estar baseada na presença de CPs, para além da expressão de possíveis mecanismos de resistência específicos dos biofilmes. As CPs representam um grande desafio para o tratamento de muitos tipos de infeções e poderão contribuir para a recalcitrância ao tratamento com antimicrobianos e cronicidade de infeções associadas a biofilmes (Lewis 2008).

## 2. Abordagem clínica da otite externa por *Pseudomonas aeruginosa* em cães

### 2.1. Considerações sobre a anatomia do ouvido externo do cão

O ouvido está dividido anatomicamente em três partes: o ouvido interno, o ouvido médio e o ouvido externo (Harvey and Paterson 2014; König and Hans-Georg Liebich 2016).

O ouvido externo recebe e concentra as vibrações do ar, representando um aparelho coletor e condutor do som que através da membrana timpânica, transmite as ondas sonoras para o ouvido médio (Cole 2009; Njaa et al. 2012; König and Hans-Georg Liebich 2016).

Face à necessidade de realizar um diagnóstico em qualquer situação que envolva o ouvido externo, um clínico tem de estar consciente das estruturas e características anatómicas do mesmo, tornando assim mais rápido e acessível o reconhecimento de afeições que serão a base para o desenvolvimento de um plano de diagnóstico e posteriormente para o estabelecimento de um tratamento adequado (Njaa et al. 2012).

A constituição do ouvido externo inclui o pavilhão auricular e o meato acústico externo, ou conduto auditivo, o qual se estende até à membrana timpânica (Harvey and Paterson 2014). O pavilhão auricular é uma estrutura móvel composta por uma lâmina de cartilagem elástica, a cartilagem auricular, revestida por pele em ambos os lados e tornando-se mais espessa e menos flexível mais próximo da sua extremidade proximal (Cole 2009). É a cartilagem auricular que determina o formato do pavilhão auricular, que varia de tamanho e forma consoante a raça do animal, podendo apresentar uma conformação ereta ou pendular (Angus 2004a; Njaa et al. 2012).

O meato acústico externo (MAE) é relativamente longo nos carnívoros e encontra-se dividido em porção vertical, formada pela porção proximal da cartilagem auricular, e em porção horizontal, formado não só pela cartilagem auricular como também pela cartilagem anular (Heine 2004; Cole 2009). O conduto auditivo dos canídeos apresenta-se em forma de “L” onde se nota uma mudança de direção, de aproximadamente 75 graus, entre o final do conduto vertical e o início do conduto horizontal (Njaa et al. 2012). Uma das dificuldades encontradas na avaliação otoscópica do conduto auditivo externo (CAE) é a observação da parte distal da porção horizontal e da membrana timpânica, devido à presença desta curvatura no interior do conduto auditivo (Cole 2009; Njaa et al. 2012). A incisura intertrágica é a região anatómica que serve de guia para a introdução do otoscópio aquando do exame do conduto auditivo (Cole 2009; Njaa et al. 2012).

## **2.2. Microambiente do conduto auditivo externo**

A humidade relativa, temperatura e o pH são os fatores responsáveis pelo equilíbrio do microclima do conduto auditivo externo. Qualquer alteração nos mesmos pode interferir na composição da microbiota residente (Harvey and Paterson 2014).

Segundo diversos estudos, a temperatura do CAE do cão encontra-se entre 38,2°C e 38,4°C, cerca de 0,6°C abaixo da sua temperatura rectal (Grono 1970; Harvey and Paterson 2014). O espaço dentro do CAE é um local protegido do meio ambiente e a sua temperatura mantém-se praticamente inalterada face a alterações de temperatura no exterior (Grono 1970; Harvey and Paterson 2014).

A humidade relativa (HR) do conduto auditivo externo é de 80,4%, sendo considerada uma característica bastante estável em relação a alterações da HR do meio ambiente (Grono 1970b). Um dos fatores predisponentes à otite externa são as alterações de humidade no CAE, que podem ocorrer em situações nas quais não haja proteção do conduto auricular contra a entrada de água, como nos banhos ou na praia, ou excesso de aplicação de produtos de limpeza auricular (August 1988; Harvey and Paterson 2014). Em casos de otite externa, a temperatura do CAE sobe em média para os 38,9°C (Grono 1970) e a humidade relativa atinge valores mais elevados que o normal, em média de 89% (Grono 1970b).

A faixa dos valores de pH do conduto auditivo externo varia entre os 4,6 e os 7,2 e, tal como os outros parâmetros, o pH médio do CAE também aumenta em casos de otite externa (Cole 2009; Grono 1970c).

A microbiota comensal do CAE de um cão saudável é frequentemente composta por *Staphylococcus* spp., *Streptococcus* spp., *Bacillus* spp., *Corynebacterium* spp., *Micrococcus* spp. e ocasionalmente coliformes. Em raras ocasiões foram também isolados *Proteus* spp. e *Pseudomonas* spp., sendo que esta última aparece em apenas 1% dos cães saudáveis e em 20% dos cães com otite externa (Cole 2009; Petrov et al. 2013; Harvey and Paterson 2014). Para além de bactérias, a microbiota comensal do conduto auditivo também inclui leveduras, entre as quais *Malassezia pachydermatis* é a mais frequentemente identificada (Kowalski 1988; Angus 2004b).

Qualquer doença primária ou situação que resulte na alteração do equilíbrio da microbiota comensal do CAE irá favorecer o sobrecrescimento das bactérias ou leveduras presentes e, possivelmente, a colonização por agentes oportunistas. É de notar que as leveduras e bactérias comensais do CAE só podem ser consideradas potencialmente patogénicas se associadas a sintomatologia de otite (Angus 2004b).

A superfície epitelial do conduto auditivo externo é revestida por uma fina camada de cerúmen de coloração amarelada e detritos aderentes (Kowalski 1988). O cerúmen é produzido continuamente, sendo composto pelo conjunto de secreções lipídicas das glândulas sebáceas, pelas secreções das glândulas ceruminosas e por células epiteliais de descamação (Tabacca et al. 2011; Harvey and Paterson 2014). As glândulas apócrinas ou ceruminosas estão localizadas na derme mais profunda e contêm ácidos mucopolissacarídeos e fosfolipídios. Apesar da distribuição e densidade das glândulas ser claramente diferente consoante a raça e o animal, existe um padrão de distribuição onde a proporção das glândulas sebáceas tem um aumento gradual da extremidade proximal do CAE para a distal, enquanto o número de glândulas ceruminosas diminui (Angus 2004a; Cole 2009).

A componente lipídica do cerúmen dos cães pode variar muito, inclusive entre os ouvidos do mesmo animal, e é constituída principalmente por triglicéridos, esqualeno, esteroides



de esterol e ácidos gordos. Dentro destes últimos, o ácido oleico e linoleico têm propriedades antibacterianas (Stahl et al. 2013). O alto teor lipídico do cerúmen ajuda a manter a normal queratinização da epiderme, auxilia na captura e excreção de detritos produzidos tanto dentro do CAE como na entrada do mesmo, resultando num nível relativamente baixo de humidade dentro do lúmen do conduto auditivo (Tabacca et al. 2011).

Em casos de otite externa, ocorre a hipertrofia das glândulas apócrinas e o conteúdo lipídico do cerúmen diminui significativamente em comparação com os ouvidos saudáveis. A diminuição da fração de lípidos do cerúmen pode ser responsável pelo aumento da humidade relatada nos CAE de cães com otite externa. A acumulação de humidade no CAE, juntamente com a diminuição da atividade antibacteriana consequente à alteração da composição do cerúmen, resulta na maceração do revestimento epitelial, aumentando a probabilidade de infeção e multiplicação bacteriana (Kowalski 1988).

A migração epitelial das células epiteliais descamadas é um mecanismo auto-protetor de transporte que assegura que o cerúmen, os microrganismos e os detritos sejam mecanicamente removidos do interior do conduto auricular (Angus 2004b; Tabacca et al. 2011). Este processo é vital para a manutenção da homeostasia do conduto auricular e qualquer ocorrência que retarde ou influencie este mecanismo pode levar ao surgimento de otopatias (Tabacca et al. 2011).

### **2.3. A Otite Externa**

A otite externa (OE) é definida como uma inflamação do MAE de localização anterior à membrana timpânica com etiologia multifatorial, sendo uma das doenças mais comuns no cão diagnosticada na prática clínica (August 1988; Glaze 2013; MSD 2020).

A classificação da OE pode ser dividida em causas e fatores (Glaze 2013; MSD 2020). As causas primárias, tais como ectoparasitas, corpos estranhos, alergias ou hipotireoidismo, podem iniciar o processo de inflamação do conduto auditivo, posteriormente intensificado devido a causas secundárias, ou seja, infeções bacterianas e fúngicas. Infeções secundárias por *P. aeruginosa* são comuns em casos crónicos de otite externa (Nuttall 1998; Barnard and Foster 2017). O aumento da humidade no conduto auditivo, a obstrução por pólipos ou neoplasias e a conformação do pavilhão auricular estão incluídos nos fatores predisponentes. Estes fatores estão presentes antes do desenvolvimento da OE e acabam por aumentar o risco da doença, mas normalmente não são a sua causa direta. Os fatores perpetuantes correspondem às alterações progressivas do conduto auditivo resultantes da inflamação presente nas OE e incluem o edema, estenose e alterações do epitélio do conduto auditivo, bem como a fibrose ou calcificação das cartilagens envolventes e a presença de otite média. Estes fatores podem contribuir para que as alterações se tornem permanentes e para o agravamento do processo inflamatório do conduto auditivo, dificultando a resolução da OE,

mesmo após a eliminação das causas primárias que lhe deram origem (Coatesworth 2011; Njaa et al. 2012).

Na presença de sinais clínicos não é difícil diagnosticar uma OE no cão. O sinal mais comum é o prurido, que leva o animal a sacudir frequentemente a cabeça e coçar a região periauricular. Outros sinais clínicos também associados a otites incluem eritema, edema, descamação, otorreia, odor desagradável e dor à palpação da cartilagem auricular. Por vezes, em casos mais graves, o desconforto do animal é tão acentuado que pode levar à ocorrência de otohematomas, alopecia do pavilhão auricular e escoriações. No entanto, alguns animais mostram muito poucos sinais clínicos até a otite se tornar bem grave (August 1988; Jacobson 2002; Coatesworth 2011).

*P. aeruginosa* é a bactéria de Gram-negativo mais comumente isolada em casos de otite no cão (Nuttall 1998; Barnard and Foster 2017). Sendo uma bactéria invasora oportunista, pode surgir em ouvidos expostos a maior humidade devido a banhos em excesso, ou quando a população comensal está ausente após o uso repetido e prolongado de antimicrobianos (Morris et al. 2017) A presença de grandes quantidades de exsudado fluido de coloração amarelada é característica de infeções bacterianas, especialmente por bactérias de Gram-negativo, tais como *P. aeruginosa* (Kowalski 1988). Outra característica comum das infeções por esta bactéria é o aparecimento de úlceras no conduto auditivo como consequência da produção e libertação de proteases (Saridomichelakis et al. 2007; von Silva-Tarouca et al. 2019).

Para estabelecer um diagnóstico é essencial fazer uma boa anamnese seguida de um exame físico completo. Dado que a dermatite atópica é a causa mais comum de OE, representando mais de 60% das causas primárias, é também indispensável um exame dermatológico rigoroso para identificar sinais de doença de pele generalizada (Ngo et al. 2018). Seguidamente, deve-se realizar o exame otoscópico para avaliar a condição do CAE e aferir a integridade da membrana timpânica, citologia do exsudado auricular e respetiva cultura e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (Jacobson 2002; Glaze 2013).

O diagnóstico e o tratamento da OE são muitas vezes difíceis, porque existem numerosos fatores e doenças que predispõem para otite e numerosos agentes secundários que agravam o processo (Jacobson 2002). Geralmente, as otites tornam-se crónicas ou recorrentes devido a causas primárias ou a fatores perpetuantes que não foram corretamente tratados (Saridomichelakis et al. 2007). A abordagem terapêutica na OE deve passar pela identificação do agente patogénico responsável e do controle e/ou eliminação de todos os fatores e causas associados (Angus 2004b; Cole 2004).



**Figura 2 - Otite supurativa associada a infecção por *P. aeruginosa* (gentilmente cedida pela Professora Doutora Ana Mafalda Lourenço)**

#### **2.4. A relevância da citologia auricular no diagnóstico de Otite Externa**

A colheita de amostras deve ser feita sempre a partir de ambos os ouvidos em caso da sintomatologia ser bilateral, antes da utilização de qualquer agente de limpeza ou do início do tratamento com a ajuda de um cotonete ou zaragatoa (Angus 2004b). O material depositado na lâmina é corado com corante de Wright-Giemsa ou Diff-Quik e observado ao microscópio. Os esfregaços devem ser examinados principalmente quanto a três pontos importantes: presença, quantidade e morfologia das bactérias, presença e quantidade de leveduras, e presença de leucócitos, com ou sem fagocitose de bactérias (Kowalski 1988). Qualquer bactéria detetada na citologia com formato de bastonete deve ser considerada com potencial de produzir infecção. No entanto, a decisão de iniciar um tratamento deve ser sempre feita baseada na combinação dos achados citológicos e na presença e gravidade dos sinais clínicos. A existência de neutrófilos degenerados ou a visualização de bactérias intracelulares confirmam a presença de infecção (Angus 2004b; Glaze 2013).

O principal valor da citologia auricular é a identificação da morfologia bacteriana, presença de leveduras e quantificação bacteriana, que permite concluir quanto à presença de infecção. A avaliação citológica do exsudato auricular é um teste de diagnóstico simples, prático e económico, originando informações imediatamente disponíveis para o veterinário, permitindo a orientação de um tratamento terapêutico empírico racional e a tomada de decisões no momento da consulta inicial. Para além da consulta inicial, o exame citológico deve ser realizado a cada reavaliação sendo uma excelente forma de monitorizar a resposta ao tratamento (Angus 2004b).

Os veterinários são incentivados a ver a citologia como um teste obrigatório para todos os pacientes que apresentam sinais clínicos de otite externa. A não realização deste teste de diagnóstico pode resultar no uso inadequado de agentes antimicrobianos, levando ao prolongamento ou à falha do tratamento e consequente progressão da doença com disseminação de estirpes resistentes (Angus 2004b; Nuttall 2016; Barnard and Foster 2017).

## **2.5. O papel da cultura e teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA)**

A cultura bacteriana e o teste de suscetibilidade aos antimicrobianos (TSA) são recomendados em casos de otites crônicas recorrentes, quando o paciente não responde ao tratamento empírico, sempre que são identificadas bactérias em formato de bastonete na citologia, e quando se pondera o uso de antibioterapia sistêmica (Jacobson 2002; MSD 2020).

Os resultados da cultura permitem identificar quais as espécies de bactérias responsáveis pela infecção e o TSA serve de guia na escolha do antimicrobiano apropriado a aplicar. No entanto, a utilidade do TSA é limitada nos casos de OE, pois os resultados são avaliados tendo em conta a concentração do fármaco no plasma. Nem sempre estes dados são relevantes na escolha do antimicrobiano a aplicar, dado que as concentrações atingidas no conduto auditivo após aplicação tópica destes compostos são muito superiores às concentrações testadas no TSA (Angus 2004b; Nuttall 2016).

## **2.6. Tratamento**

A decisão quanto ao tratamento deve ser baseada nos sinais clínicos, bem como nos resultados de citologia, bacteriologia e TSA. Nos casos crônicos ou recorrentes deve fazer-se uma avaliação completa na tentativa de identificar e tratar causas primárias e identificar a existência de fatores predisponentes e perpetuantes. O tratamento tem como principais objetivos a limpeza do conduto auditivo, a redução da inflamação, prurido e dor, e a eliminação das bactérias presentes (Glaze 2013; Barnard and Foster 2017).

Quando a membrana timpânica se encontra íntegra, o tratamento tópico é a forma mais comum e eficaz de resolução de uma OE pois, devido ao fraco suprimento sanguíneo do conduto auditivo, qualquer composto utilizado no tratamento sistémico irá chegar ao MAE em concentrações baixas e, por outro lado, quando aplicados topicamente os antimicrobianos podem atingir concentrações no local de infecção até 1000 vezes superiores comparativamente à administração via sistémica (Buckley et al. 2013; Pye et al. 2013; Barnard and Foster 2017).

A limpeza do conduto auditivo é uma parte essencial no maneio da OE pois, para além de ter um efeito calmante, permite a remoção de detritos e do exsudado mucopurulento, aumentando a eficácia das formulações tópicas (Barnard and Foster 2017). Encontram-se comercializados vários produtos que podem ser utilizados para este fim, apresentando diferentes combinações de compostos, muitos deles com propriedades antissépticas. Os compostos ceruminolíticos atuam como surfactantes e detergentes, sendo normalmente utilizados pelo veterinário para uma primeira limpeza em consultório. A maioria dos produtos contém ácidos, tais como ácido acético, ácido cítrico, e ácido láctico que apresentam eficácia comprovada contra *P. aeruginosa*. Alguns destes compostos podem ser associados a álcool, com o objetivo de ajudar a secar o CAE (Harvey and Paterson 2014; Paterson 2016).

O trometamina com ácido etilenodiaminotetracético (Tris-EDTA) e a clorhexidina são dois compostos antissépticos presentes em algumas preparações de limpeza ótica com excelente atividade antimicrobiana. O Tris-EDTA é um agente quelante do cálcio e magnésio, que afeta a permeabilidade e integridade da membrana externa das bactérias de Gram-negativo e que interfere no funcionamento das bombas de efluxo de *P. aeruginosa*. Contribui também para a destruição física e remoção dos biofilmes, aumentando a penetração e eficácia dos antimicrobianos. Por estas razões, o Tris-EDTA é um composto que potencia a ação dos antimicrobianos e, portanto, mesmo quando o TSA possa indicar que a bactéria associada à OE apresenta resistência a um determinado antibiótico *in vitro*, um pré-tratamento com Tris-EDTA pode tornar a bactéria suscetível *in vivo* (Buckley et al. 2013; Nuttall 2016; Paterson 2016).

A maior parte das preparações tópicas para o tratamento de OE são formulações que contêm a combinação de um glucocorticóide, um antibiótico e um antifúngico (Paterson 2016; Barnard and Foster 2018). Os glucocorticóides reduzem o prurido, o edema, a exsudação, a estenose do conduto auditivo e a dor associados à otite, o que facilita a realização da limpeza e aplicação do tratamento (Nuttall 2016; MSD 2020). Para além do seu uso tópico, a maioria dos casos de OE por *P. aeruginosa*, sobretudo os casos com ulceração do conduto auditivo, beneficiam do uso sistémico de glucocorticóides, tais como a prednisolona (Barnard and Foster 2017).

Dentro das opções de antimicrobianos disponíveis para tratamento da OE, as fluoroquinolonas (FQ), tais como a enrofloxacina e a marbofloxacina, devem ser reservadas para infeções por estirpes resistentes (Nuttall 2016; Paterson 2016; Barnard and Foster 2018). A atividade bactericida das FQ é concentração-dependente, o que as torna uma boa escolha para o tratamento tópico da OE por *P. aeruginosa* (Barnard and Foster 2018).

A Polimixina B é outro antimicrobiano disponível, apresentando efeito bactericida contra bactérias de Gram-negativo (Nuttall 2016; Paterson 2016). No entanto, segundo Barnard and Foster (2018), a sua eficácia é bastante limitada e muitos isolados de *P. aeruginosa* parecem ser resistentes a este composto. Os aminoglicosídeos, como a gentamicina e a tobramicina, apresentam uma ação bactericida contra *P. aeruginosa* através da inibição da síntese proteica. A sua eficácia é ótima na presença de um meio alcalino e, pelo contrário, o seu efeito pode ser inativado por exsudado purulento, sendo por isto muito importante proceder à limpeza do conduto auditivo antes da aplicação destes compostos (Paterson 2016; Barnard and Foster 2018).

A Sulfadiazina de Prata é um antibacteriano tópico usado em medicina humana para tratar feridas por queimadura que apresenta bons resultados no tratamento da OE contra *P. aeruginosa* (Paterson 2016; Barnard and Foster 2018; von Silva-Tarouca et al. 2019). Este composto pode ser diluído em soro ou em Tris-EDTA que, segundo um estudo por Buckley et

al. (2012) potencia a atividade da Sulfadiazina de Prata contra estirpes resistentes de *P. aeruginosa*.

A OE por *P. aeruginosa* é talvez a infecção do conduto auditivo mais difícil de resolver. A maioria das estirpes de *P. aeruginosa* apresentam capacidade de resistência aos antimicrobianos geralmente utilizados, tornando o tratamento desafiante. É de extrema importância gerir as expectativas do tutor quanto à duração do tratamento, e fazê-lo compreender que o sucesso do mesmo está dependente da sua rigorosa cooperação (Barnard and Foster 2018). Devido aos vários fatores já mencionados, principalmente a presença de estirpes resistentes a antimicrobianos e a ocorrência de falhas no tratamento, a procura por opções de tratamento alternativas tem vindo a aumentar (Maruhashi et al. 2016).

### **3. Estratégias microbianas inovadoras**

#### **3.1. Contexto Atual**

A descoberta da penicilina, em 1929, marcou o início da era dos antibióticos, revolucionando o tratamento das doenças infecciosas no último século. De 1940 a 1960, foi a época de ouro dos antibióticos, já que a maior parte dos fármacos antimicrobianos usados comercialmente hoje em dia foram descobertos e desenvolvidos durante esse período (Serrano 2015). Apesar desta conquista ter permitido prolongar a esperança média de vida da população e reduzir consideravelmente a morbidade e mortalidade associadas a doenças infecciosas, vários fatores contribuíram para o aparecimento de bactérias resistentes (Yap et al. 2014; Blair et al. 2015).

Os antimicrobianos têm sido largamente utilizados mundo fora e muitos países não têm legislação para controlar o seu consumo. Em alguns países, aproximadamente 80% do consumo total de antimicrobianos importantes do ponto de vista clínico é utilizado no setor da produção animal, principalmente para promoção do crescimento de animais saudáveis (WHO 2017). O fator mais importante que influencia o aparecimento e a disseminação da resistência aos antimicrobianos é a exposição excessiva de bactérias aos mesmos. O uso indiscriminado e excessivo de antimicrobianos causa pressão seletiva, afetando os indivíduos mais sensíveis e permitindo que apenas o genótipo mais apto prospere. Apesar de a aquisição de resistências ser um processo de adaptação natural inevitável, o uso intensivo de agentes antimicrobianos na comunidade, em contexto hospitalar e na agricultura é inegavelmente responsável por fomentar e acelerar esta crise. Hoje, bactérias multirresistentes (MDR) encontram-se disseminadas na comunidade e prática clínica devido ao uso impróprio de antimicrobianos nas últimas décadas (Magiorakos et al. 2012; Yap et al. 2014; Sweeney et al. 2018).

As consequências da disseminação de estirpes multirresistentes são bastante graves, contribuindo para o aumento da frequência de falhas no tratamento e a gravidade das infecções. Conforme foi evidenciado no relatório da Organização Mundial da Saúde (WHO CIA 2018) é essencial preservar a eficácia dos medicamentos disponíveis por meio de medidas que minimizem o desenvolvimento e a disseminação da resistência aos antimicrobianos, enquanto se continuam as tentativas para desenvolver novas opções de tratamento. Este apelo é de extrema importância, uma vez que, embora haja uma necessidade reconhecida do desenvolvimento de novos antimicrobianos para uso clínico, apenas duas novas classes de antimicrobianos foram licenciadas nas últimas três décadas (Romani et al. 2013).

O lugar de destaque que os animais de companhia apresentam no núcleo familiar aumentou substancialmente nos últimos anos e a atenção é cada vez mais dedicada ao seu bem-estar resultando no aumento das despesas com cuidados veterinários. Como consequência, os mesmos antimicrobianos licenciados para uso humano são frequentemente usados em animais de estimação (Guardabassi et al. 2004). Tendo isto em consideração, devido ao aumento de resistência a antimicrobianos em todo o mundo, a OMS elaborou em 2005 uma lista que é continuamente atualizada de todos os antimicrobianos disponíveis agrupados em três categorias, com base na sua importância para a medicina humana: antimicrobianos criticamente importantes, antimicrobianos altamente importantes e antimicrobianos importantes. A lista tenta assegurar que os antimicrobianos criticamente importantes sejam administrados com prudência e pretende também contribuir para a gestão da evolução e disseminação de resistências aos antimicrobianos, indicando quais os antimicrobianos usados em animais que apresentam riscos potencialmente mais elevados para as populações humanas relativamente ao seu papel de disseminação de resistências (WHO CIA 2018).

Resultante desta convivência próxima entre animais de companhia e humanos são criadas condições favoráveis para a transmissão de bactérias resistentes entre si, por contato direto, ou através do ambiente. Cães e gatos podem ser reservatórios de bactérias resistentes de importância clínica em humanos como, por exemplo, *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA), *Enterococos* resistente à Vancomicina (VRE) e *Salmonella* Typhimurium DT104 multirresistente (Guardabassi et al. 2004).

Na maioria dos países não há registos disponíveis sobre a administração de antimicrobianos aos animais de companhia nem dados sobre a prevalência de estirpes resistentes. Como consequência, para além de ser difícil estimar a quantidade total de antimicrobianos usados, é virtualmente impossível determinar a pressão seletiva imposta pelo uso de antimicrobianos na prática clínica de pequenos animais e os seus efeitos no desenvolvimento de resistências (Guardabassi et al. 2004).

As causas mais frequentes de tratamento com antimicrobianos em cães e gatos são infecções de pele, infecções do trato respiratório, infecções do trato urinário (ITU) e otites externas (Guardabassi et al. 2004). Os fenótipos de resistência de *P. aeruginosa* são mais frequentes na espécie canina e as estirpes multirresistentes parecem surgir principalmente nos casos de otite (Cabassi et al. 2017). Tais resultados, podem ser atribuídos ao fato de as otites externas por *P. aeruginosa* serem, na sua maioria, infecções crônicas que requerem longos períodos de tratamento, contribuindo para o desenvolvimento de resistência aos antimicrobianos. Existindo falhas na identificação do agente patogénico, no controle das causas primárias e fatores predisponentes, e, simultaneamente falhas no tratamento diário por parte do tutor, as recidivas são comuns, favorecendo a evolução da infecção para a cronicidade (Angus 2004a). À data, a qualidade e quantidade dos estudos realizados com o objetivo de avaliar tratamentos para otites por *P. aeruginosa* em canídeos são baixas, sendo poucos os estudos que demonstram qual a melhor combinação de fármacos a utilizar. Portanto, a maioria das decisões terapêuticas são baseadas em dados inadequados e na experiência pessoal do clínico, ao invés de resultarem de uma base sólida de evidências (Jacobson 2002; Nuttall and Cole 2007; Barnard and Foster 2017).

Num estudo realizado durante cinco anos, com o objetivo de determinar os agentes etiológicos da otite externa canina, a sua prevalência e o seu comportamento em relação a alguns antimicrobianos, Petrov concluiu que *P. aeruginosa* era o agente microbiano envolvido na etiologia da OE com perfil de resistência mais elevado (Petrov et al. 2013). *P. aeruginosa* pertence ao grupo de bactérias designado com o acrónimo ESKAPE (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *P. aeruginosa*, e *Enterobacter spp.*), para o qual as opções terapêuticas são cada vez mais limitadas. Estes seis agentes patogénicos são a principal causa de infecções nosocomiais e são uma ameaça em todo o mundo, devido à sua capacidade de se tornarem cada vez mais resistentes a todos os antimicrobianos disponíveis (Lupo et al. 2018). A acumulação de múltiplos mecanismos de resistência em isolados clínicos e a existência de estirpes que são resistentes a todos os antimicrobianos colocou *P. aeruginosa* em destaque como uma “superbactéria” em ascensão (Alhazmi 2015).

Devido ao aparecimento crescente de resistência a antimicrobianos e face ao vasto e versátil genoma dos microrganismos, as opções de tratamento estão a diminuir drasticamente. Para gerir esta situação e controlar esta ameaça global é essencial aplicar a abordagem “Uma só Saúde” (“One Health”), que reconhece que a saúde humana está conectada à saúde animal e ao ambiente (iCF 2016). A fim de diminuir a resistência a antimicrobianos é necessário um melhor manejo do consumo de antimicrobianos na saúde humana e veterinária e é importante a continuação da implementação de campanhas de uso responsável para aumentar a consciência para esta ameaça. No futuro será crucial realizar



investigação científica com o objetivo de encontrar novas moléculas com atividade antibacteriana que possam inibir estirpes resistentes e / ou atuar em sinergia com antimicrobianos e impulsionar a sua implementação segura e gradual (Serrano et al. 2017; Ribeiro et al. 2020).

### **3.2. Algumas propostas inovadoras no combate a infecções por *P. aeruginosa***

A investigação tendo em vista o desenvolvimento e descoberta de novas alternativas terapêuticas para substituição ou complemento de antibioterapia está a ter uma ascensão cada vez mais impactante. As possibilidades do uso de inibidores de bombas de efluxo têm surgido como uma potencial estratégia terapêutica para o tratamento de afeções por *P. aeruginosa*. O PAbN (fenilalanina arginil b-naftilamida) é um inibidor de bomba de efluxo já consideravelmente bem estudado, que promove não só a passagem dos antimicrobianos para o interior da célula através de uma inibição competitiva das bombas de efluxo, como aumenta a permeabilidade da membrana externa da bactéria. Desta forma, contribui para a diminuição do potencial de virulência da bactéria e, conseqüentemente, para o aumento da sua suscetibilidade aos antimicrobianos (Ferreira 2010; Pang et al. 2019).

Outro estudo, realizado por de Sousa et al. (2011), observou que o xilitol apresenta um mecanismo de ação que dificulta a adesão de *Pseudomonas* a diferentes superfícies, propondo a utilização do xilitol como uma biomolécula promissora no combate à formação de biofilmes por esta bactéria.

A utilização de produtos naturais está a tornar-se uma alternativa cada vez mais viável como substituto da antibioterapia, encontrando-se disponíveis vários artigos científicos que descrevem a sua eficácia. Recentemente, um estudo por Maruhashi et al. (2016) demonstrou que o uso de L-Mesitran®, um gel à base de mel já com aprovação para utilização em medicina humana, foi eficaz no manejo de casos de otite externa em cães, incluindo os associados a bactérias que apresentavam resistência a vários antimicrobianos, revelando assim que este produto constitui uma alternativa possível para o tratamento de OE nestes animais.

Vários outros estudos recentes têm referido diversas terapêuticas inovadoras alternativas ao uso de antimicrobianos como bastante eficazes em eliminar estirpes de *P. aeruginosa* resistentes a antimicrobianos. Estas estratégias podem ser usadas como alternativa ou em combinação com os antimicrobianos convencionais, e incluem a aplicação de compostos inibidores dos sistemas de “Quorum Sensing”, compostos quelantes do ferro, fagos, vacinas, nanopartículas e péptidos antimicrobianos (Chatterjee et al. 2016; Pang et al. 2019; Song et al. 2019).

Os péptidos antimicrobianos e os óleos essenciais, que têm recebido um grande destaque devido às suas propriedades antimicrobianas, constituíram o foco deste trabalho e serão abordados em seguida.

### **3.2.1. Óleos essenciais**

A humanidade recorre às propriedades terapêuticas dos produtos naturais (PN) desde os tempos primordiais (Sim et al. 2019). A procura do alívio da dor e da cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização destes produtos (Viegas et al. 2006). O uso de produtos naturais como medicamentos tem sido descrito ao longo da história, sendo utilizados na forma de medicamentos tradicionais, remédios, poções e óleos, os quais podem incluir compostos bioativos ainda não identificados (Dias et al. 2012). Ao longo dos últimos anos, os PN e os óleos essenciais têm sido considerados compostos com grande potencial como nova abordagem no combate aos microrganismos resistentes a antimicrobianos. Neste contexto, os PN têm recuperado espaço e importância na indústria farmacêutica como fonte de novas moléculas bioativas (Viegas et al. 2006).

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis produzidas pelas plantas como metabolitos secundários, usados principalmente em aromaterapia, cosméticos e compostos medicinais (Dias et al. 2012; Yap et al. 2014). Os óleos são chamados de “essenciais” porque representam a própria essência e a parte mais importante da planta. Existem diferenças distintas entre óleos essenciais e extratos vegetais brutos em termos de pureza, composição e processo de aquisição. Geralmente, o extrato dos óleos essenciais é obtido a partir das flores, botões, caules, folhas, sementes, galhos, raízes, frutos e cascas através de destilação a vapor ou extração mecânica, enquanto os extratos simples de plantas são frequentemente obtidos através do uso de solventes como acetona, etanol ou hexano (Yap et al. 2014). Durante a destilação, o condensado de água é separado por gravidade, deixando uma pequena quantidade de líquido volátil que é o óleo essencial. Portanto, os óleos essenciais são extremamente concentrados devido à natureza do seu processo de extração e, tecnicamente, não são óleos verdadeiros, pois não apresentam conteúdo lipídico, constituindo compostos voláteis altamente complexos (Yap et al. 2014). As propriedades biológicas e aromáticas especiais dos óleos essenciais devem-se aos terpenos e fenilpropanóides, que são os seus principais componentes (Tariq et al. 2019). A sua atividade contra bactérias e fungos deve-se à presença de fito-componentes, cuja concentração pode variar dependendo de uma série de fatores, como o estadio de crescimento da planta, condições climáticas, métodos de cultivo e colheita e técnicas de preparação do óleo essencial (Nogueira et al. 2008).

Vários óleos de diferentes plantas, como tomilho, orégãos, menta, canela, cominhos, sálvia, cravo, eucalipto e lavanda, foram analisados por possuírem diferentes propriedades biológicas, incluindo atividades anti-inflamatórias, sedativas, digestivas, antimicrobianas, antivirais, antioxidantes e citotóxicas (Tariq et al. 2019; Ribeiro et al. 2020). O óleo essencial de lavanda (OEL) é conhecido como um dos óleos essenciais mais populares, podendo ser extraído de várias espécies de plantas de lavanda. Existem quatro espécies principais de lavanda: *Lavandula latifolia*, *Lavandula angustifolia*, *Lavandula stoechas* e *Lavandula x intermedia* (um cruzamento estéril entre *L. latifolia* e *L. angustifolia*). Entre elas, *Lavandula angustifolia* é a espécie mais amplamente cultivada, sendo comumente reconhecida como lavanda comercial (Cavanagh and Wilkinson 2005). O OEL é composto principalmente por monoterpenóides e sesquiterpenóides, destacando-se o linalol e o acetato de linalil (Sienkiewicz et al. 2014). O OEL possui não só atividade antibacteriana e antifúngica, mas também é conhecido por ter propriedades adstringentes e anti-inflamatórias, além de acelerar a cicatrização de feridas e reduzir as cicatrizes (Sienkiewicz et al. 2014).

Estes produtos naturais apresentam várias vantagens, incluindo menos efeitos adversos do que os antibióticos, não promoverem o desenvolvimento de resistências, serem fáceis de obter, apresentarem baixa toxicidade para mamíferos e degradarem-se rapidamente na água e no solo, podendo ser considerados produtos relativamente ecológicos (Kavanaugh and Ribbeck 2012; Quendera et al. 2019; Sim et al. 2019).

Para além da capacidade de inibir a multiplicação bacteriana, os óleos essenciais têm também a capacidade de reduzir a concentração necessária de antibióticos devido à sua atividade sinérgica (Sienkiewicz et al. 2014). A combinação entre agentes antimicrobianos convencionais e óleos essenciais é um novo conceito. Embora possam não produzir efeitos inibitórios significativos quando aplicados sozinhos, os óleos essenciais têm efeito potenciador quando usados em combinação com antibióticos. De facto, a atividade sinérgica com óleos essenciais permite reduzir a dose mínima eficaz de antibióticos necessária para o tratamento de infeções (Ribeiro et al. 2020).

Têm sido realizados vários estudos relativos à aplicação dos óleos essenciais nas mais diversas áreas da medicina veterinária, tais como, no tratamento de infeções do trato urinário por *Escherichia coli* e *Enterococcus* spp em animais de companhia (Ebani et al. 2018), ou na desinfecção de aviários, e na administração em conjunto com *Saccharomyces cerevisiae*, um probiótico comumente utilizado, como estratégia para evitar a colonização intestinal por *Salmonella* em frangos (Ebani et al. 2019).

Num estudo realizado por Kavanaugh et al. em 2012, os óleos essenciais de cássia, bálsamo do Perú e óleo essencial de tomilho vermelho, apresentaram maior eficácia do que a colistina para erradicar biofilmes de *P. aeruginosa*, indicando-os como possíveis escolhas eficazes no tratamento de infeções por biofilmes. Estudos com estirpes de *P. aeruginosa*

mostraram que os óleos de orégão (carvacrol) e tomilho (timol) interferem nas fases iniciais de aderência e também na formação de biofilmes por *P. aeruginosa* (El et al. 2011). O cinamaldeído (CAD), um dos constituintes principais do óleo de canela, tem sido estudado pelas suas propriedades antimicrobianas contra um conjunto de bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo, incluindo *P. aeruginosa*. Um estudo feito na Austrália por Topa et al. (2018) observou que o CAD destruiu 75,6% dos biofilmes formados por *P. aeruginosa* e, além disso, concluiu que este óleo tinha a capacidade de prejudicar a formação dos biofilmes e a capacidade de multiplicação de *P. aeruginosa* (Topa et al. 2018).

Atualmente, a exploração de produtos naturais para usos medicinais é uma tendência em crescimento. Uma vez que menos de 10% da biodiversidade mundial foi avaliada relativamente à sua potencial atividade biológica, muitos compostos naturais podem ainda ser descobertos (Dias et al. 2012). Além disso, também se tem desenvolvido investigação no sentido de otimizar ao máximo o potencial dos óleos essenciais. Devido ao seu amplo espectro de atividade, os óleos essenciais constituem uma possível arma valiosa contra infecções por microrganismos multirresistentes, representando um grupo relevante de possíveis novos compostos antimicrobianos (Kavanaugh and Ribbeck 2012; Yap et al. 2014).

### **3.2.2. Péptidos Antimicrobianos**

Os péptidos antimicrobianos (AMPs do inglês “antimicrobial peptides”) são um conjunto único e variado de moléculas produzidas pela maioria dos organismos vivos, tanto eucariotas como procariotas, incluindo bactérias, fungos, animais e plantas, fazendo parte da sua estratégia de defesa imunitária inata e fornecendo uma primeira barreira contra potenciais agentes patogénicos (Wang et al. 2016; Lei et al. 2019; Cardoso et al. 2020).

Os AMPs são polipéptidos com geralmente 10–50 resíduos de aminoácidos, podendo alguns chegar a ter mais de 100 aminoácidos (Serrano 2015; Haney et al. 2017), e possuindo uma eficácia antimicrobiana potente e de amplo espectro contra bactérias, fungos e vírus (Serrano 2015; Lei et al. 2019).

Nos mamíferos os AMPs encontram-se em locais como a pele, mucosas e fluidos e são produzidos por células epiteliais e células do sistema imunitário, tais como, linfócitos, neutrófilos, eosinófilos e plaquetas (Bahar and Ren 2013; Serrano 2015). Os AMPs em mamíferos têm um papel central na proteção contra infeções por meio da ativação, amplificação e regulação das respostas imunes inatas e adquiridas do hospedeiro. Os AMPs são capazes de aumentar a fagocitose, estimular a libertação de prostaglandina, promover o recrutamento e a acumulação de várias células imunitárias em locais inflamatórios. Estas moléculas desempenham um papel importante na indução de quimiocinas, na inibição de respostas inflamatórias induzidas por LPS, na quimiotaxia, na cicatrização de feridas e na

modulação das respostas das células dendríticas ou células T (Bahar and Ren 2013; Serrano 2015; Lei et al. 2019).

O primeiro AMP foi descoberto em 1939, quando uma substância com propriedades antimicrobianas, chamada gramicidina, foi isolada a partir de *Bacillus brevis*, exibindo atividade *in vitro* e *in vivo* contra várias bactérias de Gram-positivo (Bahar and Ren 2013; Phoenix et al. 2013).

Atualmente, a base de dados LAMP (“Linking AMPs”) contém mais de 5500 sequências de AMPs, das quais aproximadamente 4000 são naturais e cerca de 1500 correspondem a péptidos sintéticos. A LAMP fornece informações sobre as características de cada péptido e estes dados estão interligados com outras plataformas existentes, constituindo um recurso útil para estudos e síntese de novos AMPs (Zhao et al. 2013).

Um importante grupo de AMPs é formado por péptidos catiónicos, ricos em aminoácidos hidrofóbicos e cargas positivas devido à presença de grandes quantidades de lisina e arginina. Estas duas características permitem a estes AMPs estabelecer uma estrutura secundária anfipática, com domínios hidrofílicos e hidrofóbicos. Estas estruturas dão-lhes a capacidade de se ligarem a componentes lipídicos (região hidrofóbica) e grupos fosfolipídios (região hidrofílica), e possibilitam a sua interação com as membranas celulares dos microrganismos (Bahar and Ren 2013; Bechinger and Gorr 2017; Haney et al. 2017; Lei et al. 2019). Alguns AMPs de maiores dimensões garantem a sua estabilidade intramolecular através de ligações dissulfeto originando uma conformação relativamente restrita e limitando a sua flexibilidade estrutural (Bahar and Ren 2013)

Apesar de terem vários mecanismos de ação, a principal atividade exercida pelos AMPs consiste na interação com a membrana celular dos microrganismos, provocando alterações na sua estrutura e conseqüente lise celular e permeabilização da membrana (Toke 2005; Henriques et al. 2006). Para células bacterianas, o contato inicial depende da ocorrência de uma atração eletrostática entre os resíduos catiónicos dos AMPs e as moléculas aniónicas na superfície da célula bacteriana, mais especificamente, a camada LPS na membrana externa das bactérias de Gram-negativo e os ácidos lipoteicóicos da parede celular das bactérias de Gram-positivo (Baltzer and Brown 2011; Bahar and Ren 2013; Mahlapuu et al. 2016). Alguns AMPs interagem com alvos intracelulares. Uma vez dentro da célula bacteriana, os AMPs promovem a inibição de processos celulares e metabólicos importantes, como a inibição da síntese da parede celular e inibição da síntese do ADN, RNA e proteínas (Toke 2005; Henriques et al. 2006; Guilhelmelli et al. 2013; Mahlapuu et al. 2016).

Os AMPs podem exibir atividades diferentes, não existindo um mecanismo ou local de ação comum a todos. É provável que a maioria dos AMPs apresente vários mecanismos de ação simultâneos, como a permeabilização da membrana e efeitos intracelulares. Isso

ajudaria a explicar a atividade de amplo espectro dos AMPs e a escassez de resistência bacteriana aos AMPs (Serrano 2015).

As bactérias não parecem desenvolver resistência aos AMPs tão facilmente como em relação aos antimicrobianos convencionais. Uma vez que estes atuam após interação eletrostática com as membranas bacterianas aniônicas, para desenvolverem resistência aos AMPs as bactérias teriam que alterar a composição da sua membrana externa, uma estrutura quase universal entre estas. Além disso, os AMPs têm uma ação muito rápida na ruptura da membrana celular bacteriana. Esta interação de curta duração, entre o organismo e o AMP, promove a morte rápida das bactérias e diminui a probabilidade de desenvolvimento de resistências (Bahar and Ren 2013; Serrano 2015). No entanto, é importante referir que existem algumas bactérias que conseguem desenvolver resistência aos AMPs catiónicos através de vários mecanismos, tais como, promovendo a degradação dos AMPs através da expressão de proteases ou promovendo a sua remoção do interior da célula bacteriana através da ativação de bombas de efluxo (Serrano 2015). As bactérias comensais do hospedeiro, e algumas bactérias invasoras têm claramente a capacidade de coexistir com ou resistir aos efeitos dos AMPs do hospedeiro, sendo que é importante considerar a hipótese de certos agentes patogênicos terem a capacidade de conseguir desenvolver resistências contra os AMPs utilizados como antimicrobianos terapêuticos (Bechinger and Gorr 2017).

Considerando a necessidade de desenvolver novos agentes antimicrobianos, várias linhas de investigação têm sido desenvolvidas com o objetivo de encontrar novos compostos funcionais mais eficazes, mais seletivos e seguros, que possam ser usados como alternativa aos antibióticos. A opção mais promissora, até o momento, é o desenvolvimento de péptidos antimicrobianos sintéticos. Como os AMPs são constituídos por aminoácidos, é relativamente fácil modificar a sua estrutura, e criar novos AMPs totalmente sintéticos, com características químicas, físicas e estruturais precisas. Essas modificações têm potencial para alterar os alvos dos AMPs, melhorar a sua estabilidade contra a ação de proteases e promover uma ação direcionada contra espécies bacterianas bem definidas, por exemplo, *P. aeruginosa* (Bahar and Ren 2013; iCF 2016)

O AMP2041 é um péptido antimicrobiano sintético, pertencente a uma nova família de AMPs catiónicos, que demonstrou boa atividade antimicrobiana contra um conjunto de bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo (Romani et al. 2013; Cabassi et al. 2017). A característica especial do péptido patenteado AMP2041 é sua ação seletiva, que se baseia no reconhecimento das diferenças na carga e composição das membranas citoplasmáticas de células eucarióticas e procarióticas. O péptido AMP2041 também tem um excelente perfil de segurança, que foi avaliado por meio de testes *in vitro* realizados em células epiteliais de animais, para além de outras vantagens descritas na tabela 1 (iCF 2016).

Tabela 1 - Características do péptido AMP2041 (iCF 2016)

AMP2041
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ação de amplo espectro contra fungos e bactérias de Gram-negativo (<i>Escherichia coli</i>, <i>P. aeruginosa</i>, <i>Salmonella</i> spp.) e de Gram-positivo (<i>S. aureus</i>, MRSA)</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Eficaz contra <i>Candida albicans</i> e <i>Malassezia pachydermatis</i></li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Alto grau de solubilidade em meio aquoso que garante a sua fácil inclusão em diversas formulações</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Estabilidade de alto grau garantida por pontes dissulfeto</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Especificidade para células procarióticas</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ação sinérgica com antimicrobianos convencionais</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Ação sinérgica com clorhexidina</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Sem desenvolvimento de resistências bacterianas observado</li> </ul>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Segurança na utilização</li> </ul>

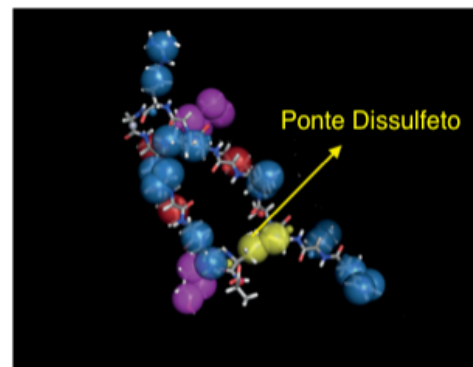


Figura 3 - Esquema do péptido AMP2041 (iCF 2016)

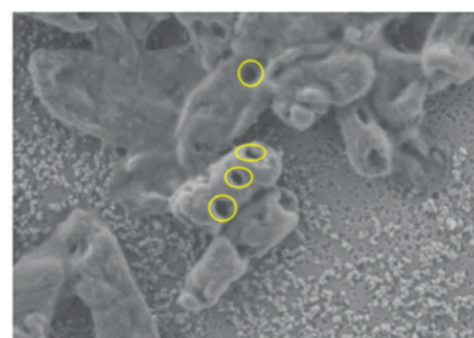


Figura 4 – Formação de poros (círculos a amarelo) nas membranas celulares pelo AMP2041 (iCF 2016)

Um estudo por Cabassi et al. (2017) confirmou, através de testes *in vitro*, a atividade antimicrobiana do AMP2041 contra estirpes multirresistentes de *P. aeruginosa* de origem humana e animal. Os isolados de origem humana foram obtidos a partir de pacientes com Fibrose Cística, e os de origem animal provinham de pacientes com otite externa. Este estudo mostrou também que, após incubação com o AMP2041, a superfície das paredes celulares de *P. aeruginosa* perdia a morfologia lisa e regular, passando a apresentar múltiplas falhas e crateras. Deste modo, este estudo comprovou que a atividade antimicrobiana do AMP2041 está associada a alterações na morfologia da parede celular e do consequente aumento da sua permeabilidade.

Os AMPs são candidatos ideais para o desenvolvimento de novas estratégias antimicrobianas. As terapias baseadas em AMPs têm um alto potencial para se tornarem armas antimicrobianas valiosas nos próximos anos pois estes compostos são relativamente pequenos e, portanto, fáceis de sintetizar, têm ação rápida, oferecem uma atividade antimicrobiana de amplo espectro e baixa propensão para o desenvolvimento de resistências (Baltzer and Brown 2011). Os AMPs têm um efeito sinérgico com fármacos antimicrobianos e, portanto, o uso de tratamentos combinados proporciona maior eficácia e fornece a

oportunidade de diminuir a dosagem destes compostos (Romani et al. 2013; Pletzer and Hancock 2016). Além disso, foi demonstrado que os AMPs têm a capacidade de interferir com a matriz extracelular do biofilme tornando as bactérias mais suscetíveis ao posterior tratamento com antimicrobianos (Batoni et al. 2016; Pletzer et al. 2016; Bechinger and Gorr 2017).

Apesar das características vantajosas dos AMPs, ainda existem alguns desafios na sua introdução no mercado e posterior utilização, tais como potencial toxicidade indesejada contra células eucarióticas, sensibilidade a condições ambientais adversas (suscetibilidade a proteases e pH extremo), falta de seletividade contra estirpes específicas, altos custos de produção, e resistência bacteriana contra alguns AMPs (Bahar and Ren 2013; Serrano 2015). Hoje em dia, os AMPs são projetados e desenvolvidos para diversas aplicações, não apenas para o tratamento de infecções bacterianas, mas também para aplicação como agentes conservantes de alimentos, revestimentos para implantes, cateteres e pensos para feridas (Serrano 2015).

Embora os AMPs possam no futuro serem utilizados eficazmente como agentes terapêuticos, ainda é necessário um trabalho significativo para explorar possíveis efeitos secundários *in vivo* e para determinar as melhores combinações com antibióticos (Baltzer and Brown 2011).



## **PARTE III – DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL**

### **1. Objetivos e fases experimentais**

Este estudo teve como primeiro objetivo a avaliação e comparação *in vitro* do potencial antimicrobiano de um antibiótico (Gentamicina), um gel otológico suplementado com um péptido (Peptivet®) e um óleo essencial (Óleo essencial de Lavanda) para controlo da otite externa por *P. aeruginosa* em canídeos. Teve ainda como segundo objetivo a avaliação do impacto do cerúmen canino na atividade antimicrobiana do Peptivet®, com o objetivo de avaliar se a eficácia inibitória deste gel se mantém em condições que melhor mimetizam as encontradas *in vivo* no conduto auditivo com OE.

Para tal, utilizou-se uma coleção de 35 isolados clínicos de *P. aeruginosa* obtidos a partir do conduto auditivo de cães com sinais clínicos de otite externa, os quais foram primeiramente caracterizados relativamente à sua capacidade de produção de biofilme, de modo que nas etapas seguintes apenas fossem utilizados isolados com a capacidade de formação de biofilme.

Posteriormente, avaliou-se o potencial da Gentamicina, do Peptivet® e do Óleo essencial de Lavanda (OL) em concentrações iguais às utilizadas na prática clínica para inibir e erradicar biofilmes de *P. aeruginosa*.

Por fim, procedeu-se à avaliação do impacto do cerúmen canino na atividade antimicrobiana do Peptivet®, com o objetivo de avaliar o potencial inibitório deste produto em condições que melhor mimetizam as observadas *in vivo*.

### **2. Materiais e métodos**

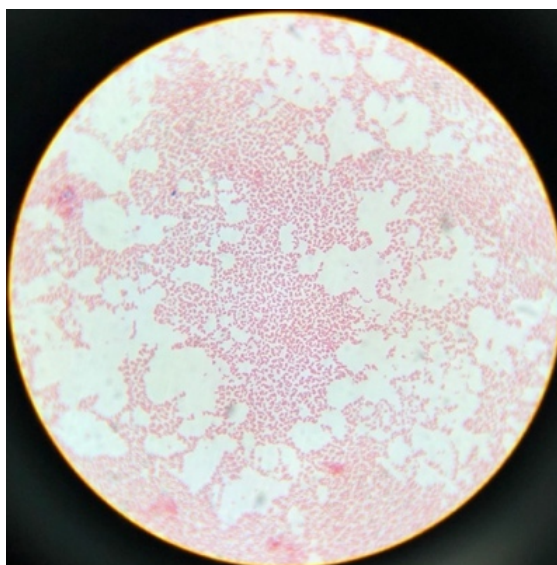
#### **2.1. Isolados bacterianos**

Neste estudo foi utilizada uma coleção de 35 isolados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa* obtidos a partir do conduto auditivo de cães com suspeita de otite externa, pertencente ao Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Faculdade de Medicina Veterinária da Universidade de Lisboa. Os isolados foram provenientes de casos clínicos seguidos no Hospital Escolar da Faculdade de Medicina Veterinária e é possível conferir o ano de recolha e o perfil de resistências dos selecionados para o estudo no anexo 1. Todos os isolados clínicos da coleção foram propagados em Columbia Blood Agar (COS) (Columbia blood agar, VWR® Chemicals, ref. 100253ZF), um meio de enriquecimento, de forma a garantir a pureza das culturas a utilizar neste trabalho, confirmada após avaliação morfológica das colónias obtidas em meio sólido e observação microscópica dos isolados após coloração de Gram.

Todos os isolados clínicos em estudo foram previamente caracterizados em relação ao seu perfil de resistência a antimicrobianos.

Como controlo foi utilizada a estirpe de referência *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853<sup>®</sup> e, para a avaliação da produção de biofilmes, foi também utilizada como controlo a estirpe de referência *Escherichia coli* ATCC<sup>®</sup> 25922<sup>™</sup>.

Durante o período de realização deste projeto os isolados foram mantidos numa solução de água peptonada tamponada (Buffered Peptone Water, BPW) com 20% de glicerol, em criotubos armazenados a -20°C, e quando necessário os isolados eram propagados em meio Brain Heart Infusion (BHI) com adição de agar (Brain heart infusion broth, VWR<sup>®</sup> Chemicals, ref. 84626.0500; Agar, VWR<sup>®</sup> Chemicals, ref. 84609.0500, BHI-agar), um meio de enriquecimento inespecífico, e posteriormente incubados a 37°C, durante 24 horas.



**Figura 5 - Avaliação microscópica de um dos isolados de *P. aeruginosa* em estudo após coloração de Gram (original do autor)**

## **2.2. Avaliação da capacidade de formação de biofilme pelos isolados em estudo**

A capacidade de produção de biofilme pelos isolados seleccionados para este estudo foi avaliada *in vitro* através do método de propagação em meio BHI-agar suplementado com sacarose a 5% (Sigma, S-9378) e com corante Vermelho de Congo (Sigma-Aldrich, C6767) a 0,0008% (Freeman et al. 1989; Oliveira et al. 2006).

Após sementeira, as culturas foram incubadas a 37°C durante 72 horas, período durante o qual a morfologia das colónias foi observada e registada após 24, 48 e 72 horas de incubação. Os isolados produtores de biofilme (n=12) originaram colónias pretas ou escuras e apresentaram consistência seca e de aspeto cristalino. As colónias correspondentes a isolados não produtores de biofilme (n=23) mantiveram-se avermelhadas (Freeman et al. 1989; Oliveira et al. 2006).

Neste ensaio foram utilizados como controlos positivo e negativo as estirpes referência *P. aeruginosa* ATCC® 27853™ e *Escherichia coli* ATCC® 25922™, respetivamente (Figura 6).

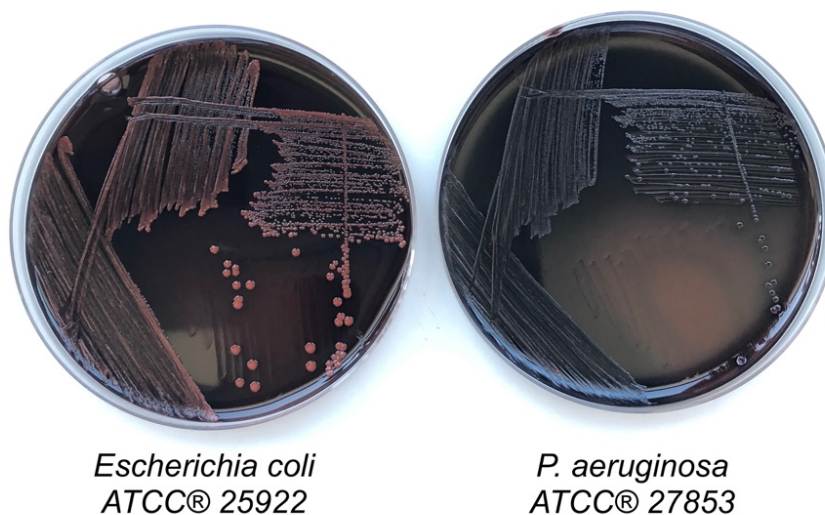


Figura 6 - Controlos utilizados no ensaio (original do autor)

### 2.3. Preparação de uma solução stock de Gentamicina

Uma solução stock de gentamicina em água estéril foi preparada a partir de gentamicina em pó (G3632 Sigma Aldrich, Merck®) tal como descrito pelo fabricante, de modo a obter uma solução com uma concentração de 1505 UI/ml, que corresponde à concentração de gentamicina presente no produto comercial Easotic (Virbac). A solução foi esterilizada por filtração (Firilabo, 0.22µm, ref. FJ25BSCPS002AL01) e armazenada a 4°C durante o período de realização do estudo.

### 2.4. Preparação da solução de lavagem de Tris-EDTA e clorhexidina

Uma solução de lavagem com a concentração de 0,25g/100mL de Tris-EDTA (Tris, nzytech, MB01601; EDTA, Sigma, ED2SS) e 0,15mg/100mL de digluconato de clorhexidina (AGA, Portugal) foi preparada em água estéril, sendo estas concentrações correspondentes às encontradas no produto comercial de lavagem auricular Otodine® (iCF).

### 2.5. Peptivet®

Este gel otológico, da marca ICF, tem como princípios ativos 0,5µg/mL do péptido AMP2041 (0,0001%), 0,07% de digluconato de clorhexidina, 0,4% de Tris e 0,1% de EDTA (Ghibaudo). Tem também na sua constituição vitamina PP, zinco PCA, glicerosfosfoinositol, sal de lisina, celulose, polivinilpirrolidona e água purificada (Peptivet, 2021).

## **2.6. Óleo essencial de Lavanda (OEL)**

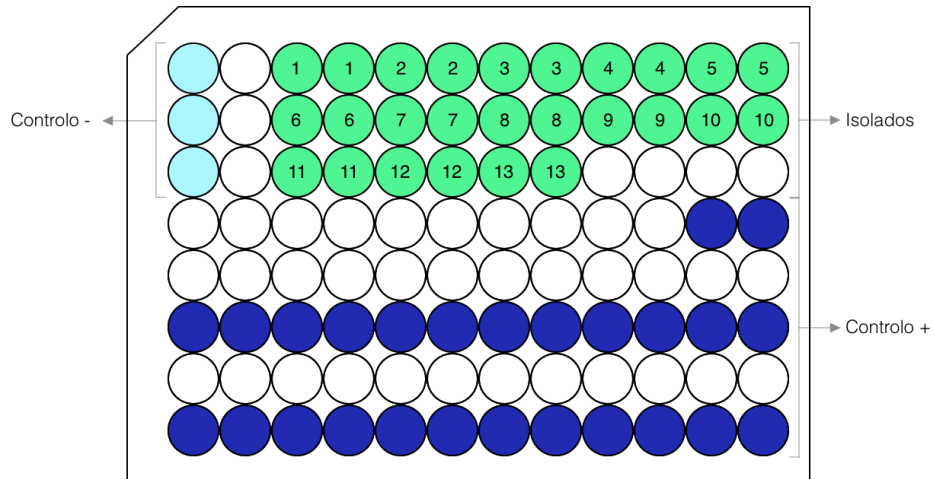
Neste estudo foi utilizado um Óleo essencial de Lavanda (OEL) biológico 100% puro, derivado da planta *Lavandula angustifolia*. O produto utilizado foi produzido pela marca Biover, a qual faz a extração do óleo através de destilação por vapor de água a partir da flor da planta (Biover...c2021).

## **2.7. Comparação do potencial antimicrobiano da Gentamicina, Peptivet® e Óleo de Lavanda utilizando um modelo *in vitro* de biofilme de *P. aeruginosa***

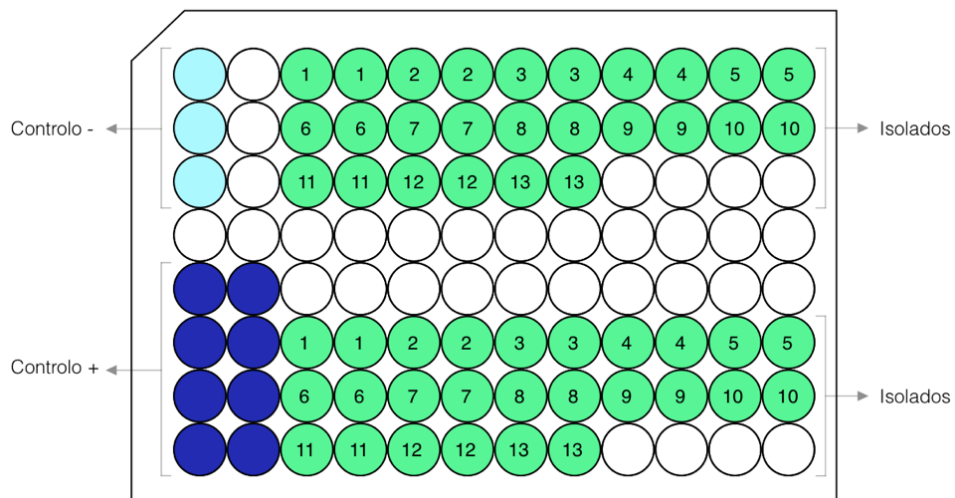
Para determinação da capacidade inibitória (CIB) e de erradicação de biofilme (CEB), foram realizadas suspensões bacterianas em NaCl 0,9% (Sodium chloride, Merck KGaA, ref. 1.06404.1000) estéril com um grau de turvação de 0,5 na escala de MacFarland (correspondendo aproximadamente a uma concentração bacteriana de  $10^8$  UFC/mL). Estas suspensões foram realizadas para cada um dos isolados a partir de culturas em BHI-agar com 24 horas de incubação. Por fim, as suspensões foram sujeitas a uma diluição de 1:10, em meio Tryptic Soy broth (TSB) (Tryptic soy broth, VWR® Chemicals, ref. 84675.0500) suplementado com glucose a 25% (D(+)-Glucose monohydrate, Merck KGaA, ref. 1.04074.0500) de forma a obter suspensões finais com concentração bacteriana de  $10^7$  UFC/mL.

O biofilme foi estabelecido numa tampa com pinos de poliestireno (Nunc-TSP, Thermo Scientific, ref. 445497) utilizada como superfície abiótica para adesão bacteriana e desenvolvimento do biofilme, inserida numa microplaca de 96 poços (Nunc™ MicroWell™ 96-Well Microplates, Thermo Scientific™, ref. 152038).

Para tal, as suspensões bacterianas foram distribuídas em duas microplacas de 96 poços, tal como indicado nas figuras 7 e 8. Nos poços correspondentes aos controlos positivos foram adicionados 200µL das suspensões bacterianas de cada isolado; nos poços correspondentes aos controlos negativos foram colocados 200µL do meio de cultura utilizado; e nos poços teste foram adicionados, em duplicado, 200µL de cada uma das 13 suspensões bacterianas diluídas.

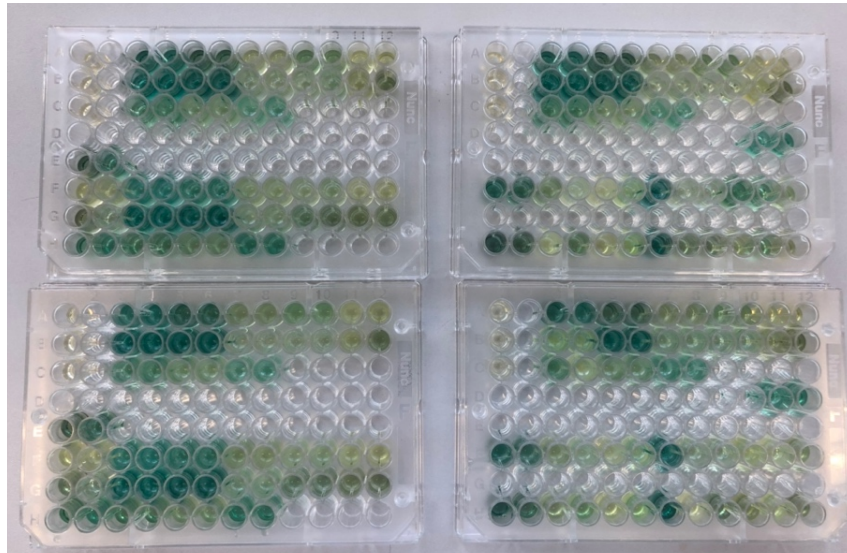


**Figura 7 - Esquema representativo da distribuição das suspensões bacterianas numa microplaca de 96 poços (original do autor)**



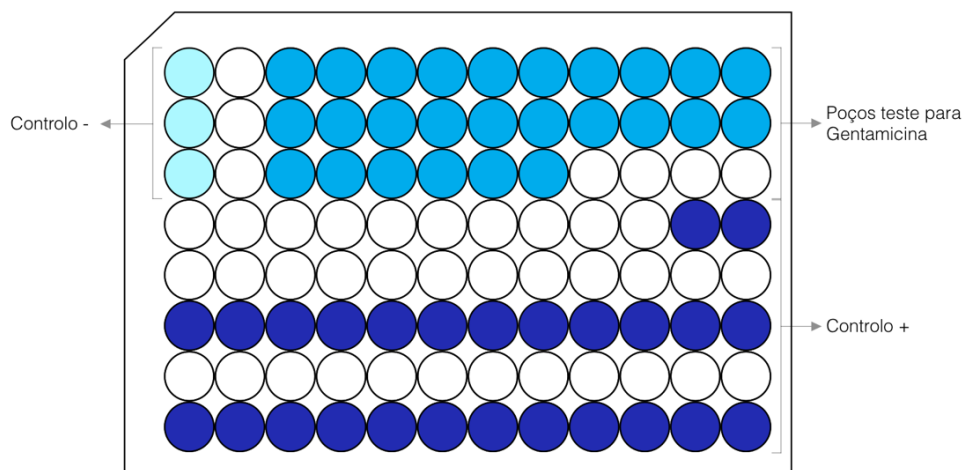
**Figura 8 - Esquema representativo da distribuição das suspensões bacterianas numa microplaca de 96 poços (original do autor)**

Após 72 horas de incubação a 37°C (figura 10), as tampas com pinos foram retiradas e colocadas em microplacas previamente preenchidas com 200µL de solução de lavagem Tris-EDTA+clorhexidina em todos os poços, exceto nos poços correspondentes ao controlo negativo e a uma linha dos controlos positivos, que foram preenchidos com 200µL de NaCl 0,9%. Assim, a solução de lavagem foi avaliada quanto à sua capacidade de erradicação isoladamente. Após um período de agitação manual de 30 segundos à temperatura ambiente, as placas foram incubadas a 37°C, durante 20 minutos, de forma a mimetizar a temperatura do conduto auditivo do cão e o tempo correspondente ao protocolo de lavagem auricular utilizado na prática clínica (Barnard and Foster 2018).

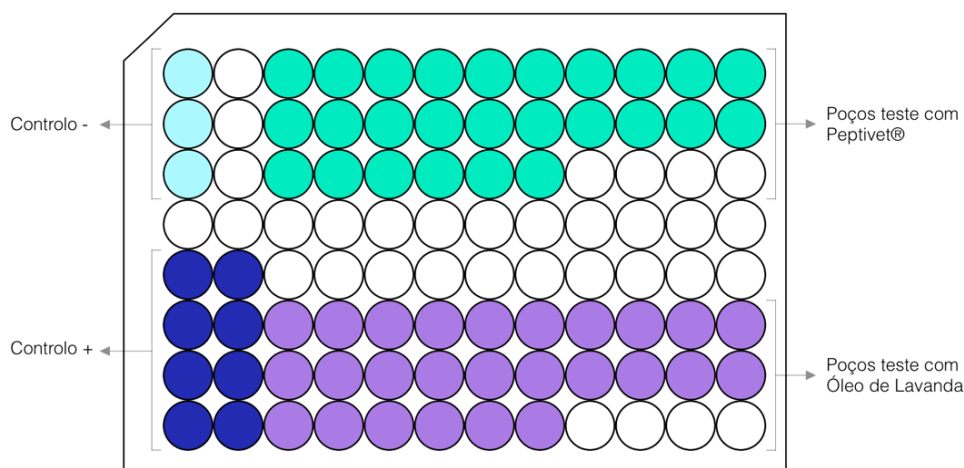


**Figura 9 - Biofilme formado na microplaca após 72 horas de incubação a 37°C (original do autor)**

Após incubação, as tampas com pinos foram transferidas para novas microplacas previamente preenchidas com 100µL dos compostos antimicrobianos em estudo (Gentamicina, Peptivet® e Óleo de Lavanda) e 100µL de meio TSB, tal como representado nas imagens 10 e 11. Os poços correspondentes ao controlo negativo e controlo positivo foram preenchidos com 200µL de meio TSB suplementado com glucose a 25%. As microplacas foram incubadas a 37°C, sendo que uma das réplicas foi sujeita a um período de incubação de 30 minutos e a outra a um período de 24 horas de incubação.



**Figura 10 - Esquema representativo de uma microplaca para determinação da CIB e CEB da Gentamicina (original do autor)**



**Figura 11 - Esquema representativo de uma microplaca para determinação da CIB e CEB do Peptivet® e Óleo de Lavanda (original do autor)**

No final de cada um dos períodos de incubação foi realizada a avaliação visual da capacidade de inibição da formação de biofilme pelos compostos antimicrobianos em estudo através da observação de turvação (resultado negativo), ou de ausência da mesma (resultado positivo), nas suspensões presentes nos poços da microplaca.

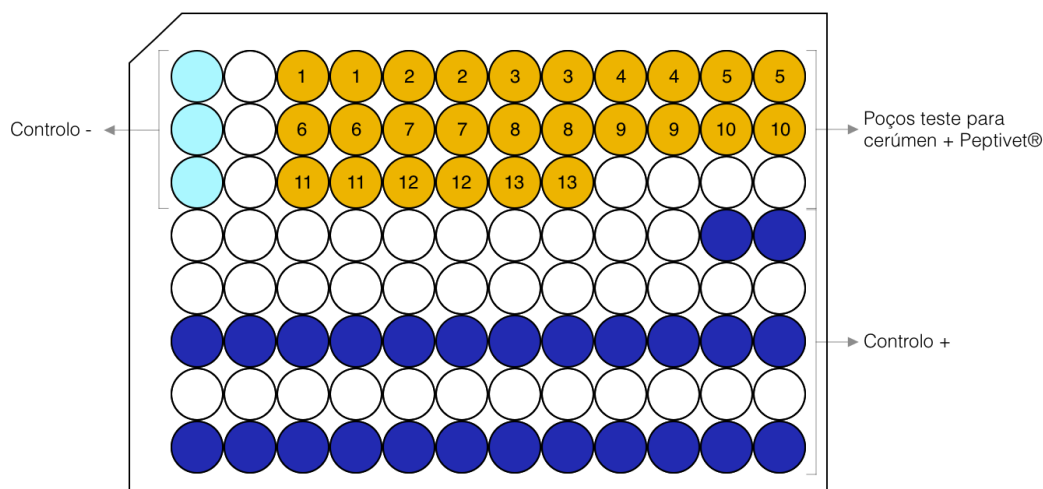
Em seguida, procedeu-se a 3 lavagens da tampa com pinos, durante 10 segundos cada, utilizando uma solução de NaCl 0,9%, de forma a remover os compostos antimicrobianos aplicados no passo anterior e eventuais células planctónicas que se encontrassem aderentes aos biofilmes. Após as lavagens, a tampa com pinos foi colocada numa nova microplaca previamente preenchida com 200µL de meio TSB suplementado com glucose a 25%. Esta nova placa foi isolada e incubada num banho de ultrassons (Grant, Ultrasonic Bath, MXB14), numa frequência alta (50–60 Hz) durante 15 minutos a 37°C, de forma a promover a libertação dos biofilmes formados nos pinos. Após sonificação, a tampa com pinos foi descartada e substituída por uma tampa lisa, a microplaca foi incubada durante 24 horas a 37°C. No final deste período, foram retirados 5 µL da suspensão presente em cada poço da microplaca e inoculados em meio BHI-agar. Após a incubação durante 24 horas a 37°C, a CEB foi determinada visualmente através da observação do desenvolvimento (resultado negativo) ou ausência (resultado positivo) de colónias nas placas.

Este ensaio foi realizado em duplicado e foi repetido independentemente em três dias diferentes.

## 2.8. Estabelecimento de um modelo *in vitro* de cerúmen de cão e avaliação seu do impacto na atividade antimicrobiana do Peptivet® relativamente a biofilmes de *P. aeruginosa*

Para este ensaio foi estabelecido um modelo *in vitro* de cerúmen de cão, constituído por 9,16% de esqualeno (Merck, 8.21068.0100), 16,62% de ácido octanóico (Merck, 8.00192.0100), 19,98% de triolato de glicerina (Acros organics, 368120050) e 54,24% de triglicéridos (Sigma, T2449), tal como descrito por Stahl et al. 2013.

Em primeiro lugar, foram estabelecidos biofilmes formados pelos isolados em estudo recorrendo a tampas de pinos inseridas em microplacas de 96 poços incubadas durante 72 horas a 37°C, posteriormente lavadas numa solução de Tris-EDTA+clorhexidina. De seguida, as tampas de pinos foram transferidas para uma nova microplaca cujos poços foram previamente preenchidos com 100µL de Peptivet® e 100µL de cerúmen, como representado na figura 12.



**Figura 12 - Esquema representativo de uma microplaca para determinação da CIB e CEB do cerúmen+Peptivet® (original do autor)**

Os poços correspondentes ao controlo negativo e ao controlo positivo foram preenchidos, respetivamente, com 200µL de meio TSB suplementado com glucose a 25% e com meio diluído em cerúmen numa proporção de 1:1. Foram realizadas duas réplicas de cada placa, uma das quais foi incubada a 37°C durante 30 minutos e a outra a 37°C durante 24 horas, posteriormente submetidas ao protocolo descrito anteriormente para avaliação da atividade antimicrobiana do péptido antimicrobiano na ausência do cerúmen.

Este ensaio foi realizado em duplicado, e repetido em três dias independentes. No entanto, devido aos resultados obtidos nos dois primeiros ensaios, na terceira repetição os poços foram preenchidos com 100µL de Peptivet®, 50µL de cerúmen e 50µL de meio TSB+glucose.



Para avaliar se algum dos componentes do cerúmen tinha um efeito inibitório relativamente a *P. aeruginosa*, realizou-se um ensaio “spot-on-lawn” com cada um dos constituintes do cerúmen. Para tal, após preparação de uma suspensão bacteriana com um grau de turvação de 0,5 na escala de MacFarland, esta foi inoculada numa placa de BHI agar através de uma sementeira em tapete, no topo da qual foram aplicadas gotas de 10µL de cada um dos componentes do cerúmen. Após 24 horas de incubação a 37°C, procedeu-se à observação das placas com vista a avaliar a presença de halos de inibição.

### **3. Resultados e Discussão**

O desenvolvimento e disseminação de microrganismos resistentes a antimicrobianos, causado por um uso impróprio destes compostos é uma grande preocupação de saúde pública, pressionando para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, que podem contrabalançar ou substituir o uso de antibióticos como agentes antimicrobianos (Duarte and Tavares 2015).

Cães e gatos representam fontes potenciais de disseminação de bactérias resistentes devido à administração extensiva de antimicrobianos a estes animais e ao seu contato próximo com pessoas (Guardabassi et al. 2004). A otite externa é uma das doenças dermatológicas mais comumente diagnosticadas em cães, frequentemente associada a estirpes de *P. aeruginosa* multirresistentes (Chan, Hickey, et al. 2019). *P. aeruginosa*, que apresenta a capacidade de produzir vários fatores de virulência, é um agente patogénico importante, responsável por várias infeções e, além disso, com a notável capacidade de formar biofilmes em muitos ambientes, estruturas que tornam os tratamentos das infeções associadas desafiantes e ineficientes. Há evidências de que as infeções mediadas por biofilmes facilitam o desenvolvimento de doenças crónicas e infeções recorrentes (Rasamiravaka et al. 2015). O aumento da prevalência de resistência antimicrobiana entre bactérias em cães com otite externa leva à necessidade de se encontrar novos agentes terapêuticos (Song et al. 2020).

Deste modo, uma das ações preconizadas pelo Plano de Ação da Comissão Europeia é o desenvolvimento de alternativas antimicrobianas eficazes para infeções em pessoas e animais, e o reforço da investigação para o desenvolvimento de meios inovadores de combater a resistência antimicrobiana (Cabassi et al. 2017; European Commission, 2017).

Os AMP representam uma alternativa promissora aos antimicrobianos convencionais. Para além da sua eficácia inibitória relativamente a um grande espetro de microrganismos, os péptidos antimicrobianos atuam também como modeladores do sistema imunitário e demonstram níveis muito baixos de resistência natural, graças ao seu duplo modo de ação, atuando através da inibição da biossíntese da parede celular e da promoção da formação de

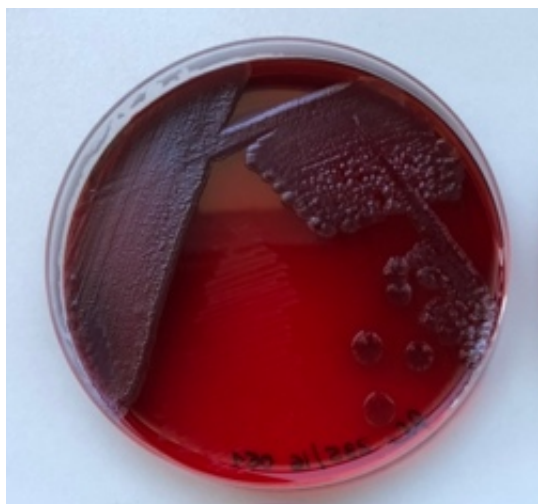
poros na membrana celular (Bechinger and Gorr 2017). A utilização de péptidos antimicrobianos tem sido investigada nos últimos anos enquanto método alternativo ao uso de antimicrobianos, para aplicação no controlo da formação de biofilmes e destruição de biofilmes previamente formados (Gorr and Abdolhosseini 2011).

### **3.1 Avaliação da capacidade de formação de biofilme pelos isolados de *P. aeruginosa* em estudo**

A formação de biofilme por espécies bacterianas é um fenómeno comum, responsável pelo encerramento das comunidades bacterianas numa matriz por elas produzida, essencialmente constituída por exopolissacáridos (Oliveira et al. 2006; Nuttall 2016). Esta matriz fornece proteção para as células bacterianas sésseis localizadas no interior do biofilme relativamente a fatores externos, como da dessecação e da resposta imunitária do hospedeiro. No caso específico de biofilmes bacterianos associados a otites, estes inibem a limpeza do conduto auditivo e impedem a penetração dos compostos antimicrobianos. Nestes casos, os biofilmes são responsáveis pela produção de uma secreção aderente, espessa, viscosa, geralmente de cor castanha escura ou preta. No exame citológico o biofilme é visualizado como um véu de espessura variada que pode dificultar a observação de bactérias e células (Nuttall 2016).

Uma vez que a organização das comunidades bacterianas sob a forma de biofilmes tem impacto no sucesso da terapia antimicrobiana, a deteção de estirpes produtoras de biofilme é um procedimento relevante para a avaliação dos fatores de virulência expressos por agentes patogénicos responsáveis por otites e pode ser importante no estabelecimento de um protocolo de tratamento adequado (Pye et al. 2013; Pericolini et al. 2018). De facto, a formação de biofilme é um importante fator de virulência em *P. aeruginosa*, facilitando o estabelecimento de infeções resistentes no conduto auditivo e dificultando a sua eliminação (Pye et al. 2013; Nuttall 2016; Pericolini et al. 2018).

Na primeira etapa deste estudo foi avaliada a capacidade de formação de biofilme por 35 isolados de *P. aeruginosa* obtidos de zaragatoas auriculares de cães com suspeita otite externa, de forma a selecionar isolados com capacidade de produção de biofilme a utilizar nas etapas posteriores do estudo.



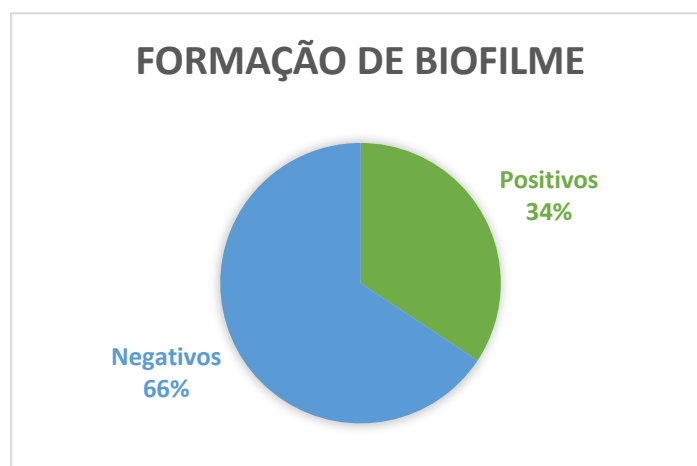
**Figura 13 - Placa de Agar Vermelho de Congo inoculada com isolados de *P. aeruginosa* positivos para a formação de biofilme (original do autor)**

Para este estudo, a avaliação da capacidade de formação de biofilmes foi realizada com recurso à técnica da análise visual da expressão fenotípica de biofilmes pelos isolados em Agar Vermelho de Congo, constituído por meio BHI-agar suplementado com corante Vermelho de Congo (Figura 13). Esta técnica permite avaliar a produção aumentada de exopolissacáridos, tendo sido desenvolvida e realizada pela primeira vez por Freeman et al. (1989), que no seu estudo descreveu que as colónias produtoras de biofilme (resultado positivo) apresentavam cor preta e consistência cristalina seca, e as estirpes não produtoras (resultado negativo) permaneciam avermelhadas. Este método de avaliação da produção de biofilme é rápido, sensível e com boa reprodutibilidade, tendo ainda a vantagem de as colónias permanecerem viáveis no meio (Freeman et al. 1989; Oliveira et al. 2006; Pericolini et al. 2018).

Neste ensaio, após inoculação, as placas foram incubadas a 37°C durante 72 horas, e os resultados registados às 24, 48 e 72 horas de incubação. Como é possível observar no gráfico 1, dos 35 isolados previamente selecionados, 12 (34%) demonstraram capacidade de formar biofilme (Gráfico 1).

Estes valores são concordantes com o estudo feito por Pye et al. (2013), onde 40% dos isolados de *P. aeruginosa* em estudo apresentou capacidade de produzir biofilme *in vitro*, avaliada através de uma técnica baseada numa microplaca de 96 poços de fundo plano, incubada a 37°C durante 24 horas, e posteriormente corada com cristal violeta a 0,1%. Num estudo por Baniya et al. (2017), onde também foi utilizado o método de avaliação da expressão fenotípica de biofilme em Agar Vermelho Congo, apenas 15,29% dos isolados de *P. aeruginosa* se revelaram formadores de biofilme, sendo esta percentagem inferior à obtida neste ensaio.

Gráfico 1 - Percentagem da capacidade de formação de biofilme pelos isolados



Através da análise da tabela 2 podemos observar que, dos 12 isolados positivos para a formação de biofilme, 3 isolados demonstraram capacidade de produzir biofilme após 24 horas de incubação, 7 isolados após 48 horas de incubação, e os restantes 2 isolados apenas apresentaram esta capacidade após 72 horas de incubação.

Neste ensaio foi utilizado um período de incubação de 72 horas de forma a ser possível uma maior discriminação entre resultados positivos e negativos, reduzindo o número de resultados indeterminados. Em concordância com Freeman et al. (1989), não foi possível observar alteração da cor do meio num intervalo de tempo inferior a 24 horas de incubação. Ao contrário do constatado por Mariana et al. (2009), a pigmentação preta das colónias positivas não diminuiu com o tempo, não tendo havido necessidade de modificar o protocolo descrito por Freeman et al. (1989).

É importante referir que tanto no estudo realizado por Freeman et al. (1989) como no de Mariana et al. (2009), as estirpes utilizadas foram, respetivamente, *Staphylococcus coagulase negativos* e *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA). Deste modo, o comportamento *in vitro* apresentado pelos isolados em estudo relativamente ao tempo de incubação necessário para produção de biofilme e a intensidade de pigmentação das colónias positivas pode ser discrepante, simplesmente por pertencerem a espécies diferentes das estudadas por estes autores.

**Tabela 2 - Resultados do ensaio de avaliação da capacidade de formação de biofilme pelos isolados de *P. aeruginosa* em estudo**

Código dos Isolados	Tempo de Incubação		
	24 horas	48 horas	72 horas
37/16	-	+	+
47/16	-	-	+
56/16	-	-	+
74/16 1	-	-	-
74/16 2	-	-	-
235/16	-	+	+
277/16	-	-	-
281/16	-	-	-
298/16	-	-	-
307/16	-	-	-
312/16	-	+	+
322/16	-	-	-
328/16	-	-	-
54/17	-	-	-
56/17	-	-	-
87/17	-	-	-
242/17	-	-	-
247/17	-	-	-
475/17 1	+	+	+
475/17 2	+	+	+
516/17	-	-	-
541/17	-	-	-
595/17	-	-	-
39/18	-	-	-
116/18	-	-	-
404/18	-	-	-
413/18 1	-	+	+
413/18 3	-	+	+
781/18	-	-	-
870/18	-	-	-
13/19	-	-	-
71/19	-	+	+
96/19	+	+	+
140/19	-	-	-
151/19	-	+	+

Legenda: (+) resultado positivo para a capacidade de produção de biofilme; (-) resultado negativo para a capacidade de produção de biofilme

Embora muitas espécies bacterianas necessitem de condições de pH ou temperatura específicas para formar biofilme, *P. aeruginosa* apresenta capacidade de produção de matriz de exopolissacarídeos sempre que as condições ambientais são apropriadas para a colonização bacteriana (Pye et al. 2013). Neste estudo apenas 34% dos isolados avaliados apresentou capacidade de produção de biofilmes, sendo que não foram identificados os fatores que possam ter afetado a formação de biofilme por estes isolados.

Ressalta-se ainda que o método aplicado avaliou apenas a expressão fenotípica da produção de biofilme, sendo que existem outros métodos para identificar estirpes positivas para este fator de virulência, nomeadamente o método de produção de biofilmes em tubo ou em microplacas de 96 poços, cultura de tecidos e aplicação de sondas específicas marcadas com fluorocromos posteriormente visualizadas por microscopia de fluorescência (Oliveira et al. 2006; Rewatkar 2013).

### **3.2 Comparação do potencial antimicrobiano da Gentamicina, Peptivet® e Óleo de Lavanda utilizando um modelo *in vitro* de biofilme de *P. aeruginosa* - avaliação da capacidade inibitória (CIB) e de erradicação (CEB) de biofilme**

A otite externa é um dos estímulos iatrogênicos mais comuns no dia a dia em clínica de animais de companhia, afetando cerca de 20% da população canina. É frequente o envolvimento de *P. aeruginosa* nesta afeição, reconhecida como o microrganismo mais problemático em cães com otite externa crónica ou recorrente (Ghibaudo et al. 2016; von Silva-Tarouca et al. 2019). Para além do tratamento de otites por *P. aeruginosa* ser desafiante devido à sua resistência intrínseca a vários antimicrobianos, nomeadamente aos utilizados de forma empírica, como os aminoglicosídeos, a sua capacidade de formar biofilmes é considerada um dos principais fatores de virulência que interfere no sucesso terapêutico (Pye et al. 2013; Cabassi et al. 2017; von Silva-Tarouca et al. 2019).

Atualmente ainda existem poucos estudos realizados para avaliar e comparar diferentes tratamentos de otites por *P. aeruginosa* e que identifiquem qual a combinação de antimicrobianos mais eficaz a aplicar neste tipo de doença, sendo que a maioria das decisões terapêuticas são baseadas apenas na preferência e experiência pessoal do médico veterinário (Jacobson 2002; Nuttall 2016; Barnard and Foster 2017).

Um dos objetivos deste estudo foi comparar a eficácia de 3 compostos antimicrobianos diferentes, procurando avaliar *in vitro* a capacidade destes compostos para inibir e/ou erradicar biofilmes quando aplicados em concentrações correspondentes às utilizadas na prática clínica.

Entre os binómios concentração/tempo de atuação testados, consideram-se como eficazes os que promoveram simultaneamente a inibição e erradicação dos biofilmes compostos pelos isolados de *P. aeruginosa*.

Os resultados obtidos após incubação dos isolados na presença dos compostos antimicrobianos em estudo durante 30 minutos podem ser observados na tabela 3.

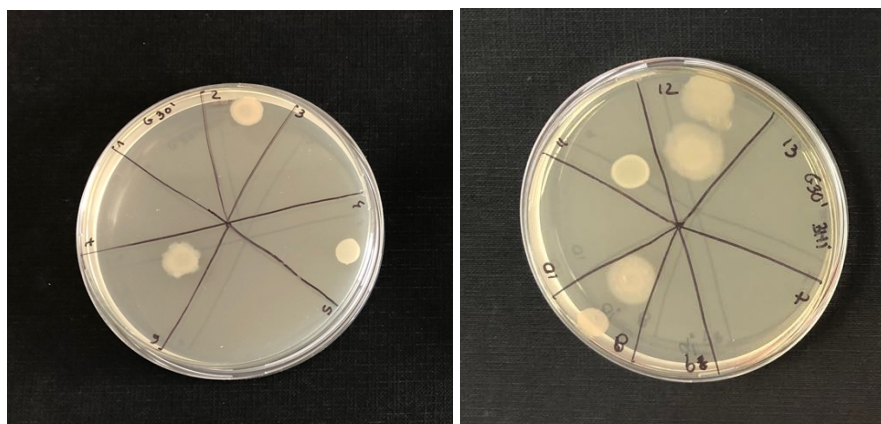
**Tabela 3 - Avaliação da capacidade de inibição e de erradicação dos compostos antimicrobianos em estudo após 30 minutos de incubação**

Número	Código dos Isolados	30 minutos					
		Gentamicina		Peptivet®		Óleo de Lavanda	
		CIB	CEB	CIB	CEB	CIB	CEB
1	37/16	+	+	+	+	-	-
2	47/16	-	-	+	+	+	+
3	56/16	+	+	+	-	+	+
4	235/16	+	-	-	-	+	+
5	312/16	+	+	+	+	+	+
6	475/17(1)	-	-	-	-	-	-
7	475/17(2)	+	+	-	-	+	-
8	413/18(1)	-	-	-	-	+	+
9	413/18(3)	+	+	+	-	+	+
10	71/19	+	+	+	-	-	-
11	96/19	-	-	+	-	-	-
12	151/19	-	-	-	-	+	+
13	ATCC 27853®	+	+	+	+	+	+

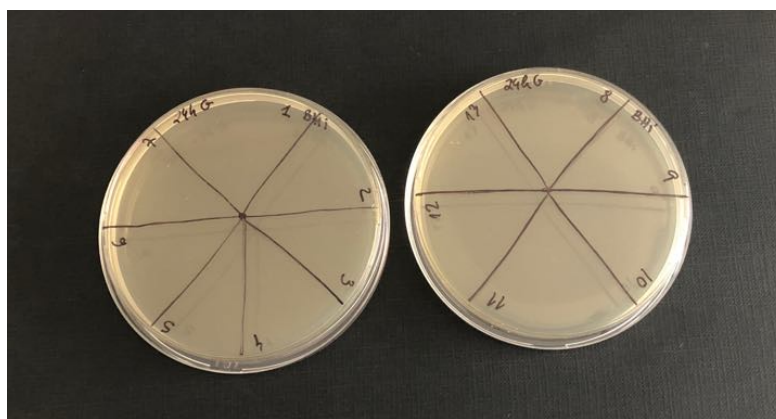
Legenda: (+) não ocorreu multiplicação bacteriana; (-) ocorreu multiplicação bacteriana; CIB: Concentração de inibição de biofilme; CEB: Concentração de erradicação de biofilme

Através da tabela 3 é possível observar que a Gentamicina (1505 UI/ml) apresentou capacidade de inibir a formação de biofilme por 8 dos isolados em estudo e de erradicar os biofilmes produzidos por 7 dos isolados. O Peptivet® teve igualmente a capacidade de inibir a formação de biofilme por 8 isolados, mas apenas apresentou capacidade de erradicar os biofilmes produzidos por 4 isolados. No caso do Óleo de Lavanda, ocorreu a inibição da produção de biofilme por 9 isolados e a erradicação dos biofilmes produzidos por 8 isolados.

Através da tabela podemos ainda constatar que nenhum dos 3 compostos antimicrobianos em estudo apresentou capacidade de inibir ou erradicar os biofilmes produzidos pelo isolado 6 e, pelo contrário, os biofilmes produzidos pelos isolados 5 e 13 (estirpe de referência) foram inibidos e erradicados por todos os compostos antimicrobianos testados.



**Figura 14 – Resultados do ensaio para avaliação da CEB da Gentamicina após incubação durante 30 minutos, onde se observa a multiplicação dos isolados 2, 4, 6, 8, 11 e 12 após incubação com este composto antimicrobiano (original do autor)**



**Figura 15 – Resultados do ensaio para avaliação da CEB da Gentamicina após incubação durante 24 horas, onde se observa que todos os isolados foram erradicados após a incubação com este composto antimicrobiano (original do autor)**

Relativamente à eficácia destes compostos antimicrobianos em inibir e erradicar biofilmes após 30 minutos de atuação, a Gentamicina demonstrou uma eficácia de 53,8%. O Óleo de Lavada teve a maior eficácia entre os 3 compostos, 61,5% e, pelo contrário, o Peptivet® demonstrou a eficácia mais baixa, apresentando aproximadamente metade da eficácia do Óleo de Lavanda (30,8%) (tabela 5).

Os resultados obtidos após 24 horas de incubação na presença dos compostos antimicrobianos em estudo podem ser observados na tabela 4.

Observando a tabela 4, é possível constatar que a Gentamicina (1505 UI/ml) apresentou a capacidade de inibir a formação de biofilme por todos os isolados de *P. aeruginosa* em estudo, bem como a capacidade de erradicar todos os biofilmes produzidos pelos isolados. O Óleo de Lavanda conseguiu inibir a formação de biofilme e erradicar os biofilmes produzidos por 10 isolados. O Peptivet® inibiu a formação de biofilme por 11 isolados e erradicou os biofilmes produzidos por 9 isolados.



**Tabela 4 - Avaliação da capacidade de inibição e de erradicação dos compostos antimicrobianos em estudo após 24 horas de incubação**

Número	Código dos Isolados	24 horas					
		Gentamicina		Peptivet®		Óleo de Lavanda	
		CIB	CEB	CIB	CEB	CIB	CEB
1	37/16	+	+	+	+	-	-
2	47/16	+	+	+	+	+	+
3	56/16	+	+	+	+	+	+
4	235/16	+	+	+	+	+	+
5	312/16	+	+	+	+	+	+
6	475/17(1)	+	+	-	-	-	-
7	475/17(2)	+	+	+	-	+	+
8	413/18(1)	+	+	-	-	+	+
9	413/18(3)	+	+	+	+	+	+
10	71/19	+	+	+	+	+	+
11	96/19	+	+	+	+	-	-
12	151/19	+	+	+	-	+	+
13	ATCC 27853®	+	+	+	+	+	+

Legenda: (+) não ocorreu multiplicação bacteriana; (-) ocorreu multiplicação bacteriana; CIB: Concentração de inibição de biofilme; CEB: Concentração de erradicação de biofilme

Com 24 horas de atuação a Gentamicina foi 100% eficaz, seguida do Óleo de Lavanda com uma eficácia de 76,9% e, novamente com a eficácia mais baixa entre os 3 compostos, do Peptivet®, que teve uma eficácia de apenas 69,2% (tabela 5).

**Tabela 5 - Eficácia média apresentada pelos compostos antimicrobianos em estudo após 30 minutos e 24 horas de incubação**

Eficácia (Média ± Desvio Padrão)	30 minutos	24 horas
Gentamicina	53,8% ± 14,1	100% ± 0
Peptivet	30,8% ± 7,6	69,2% ± 15,4
Óleo de Lavanda	61,5% ± 16	76,9% ± 13,3

Num estudo realizado por Romani et al. (2013), os autores avaliaram a capacidade inibitória dos péptidos AMP72, AMP126 e AMP2041 relativamente a bactérias de Gram-positivo e de Gram-negativo, incluindo *P. aeruginosa*, tendo observado que o péptido AMP2041 apresentou a capacidade de erradicar todos os isolados após apenas 20 minutos de atuação. Noutro estudo por Cabassi et al. (2017), onde foi avaliada a eficácia do péptido

AMP2041 contra estirpes de *P. aeruginosa* MDR (incluindo estirpes resistentes à Gentamicina), observou-se que o péptido apresentava a capacidade de erradicar 90% dos isolados após 20 minutos de incubação. Estes resultados não são concordantes com os obtidos neste estudo, sendo que em nenhum dos ensaios realizados o Peptivet® apresentou capacidade de erradicação de todos os isolados, sendo que apenas erradicou 30,8% dos isolados após 30 minutos de incubação. No entanto, é importante referir que nos dois estudos mencionados o péptido AMP2041 foi avaliado isoladamente na concentração de 12,5 µg/ml, enquanto neste estudo foi avaliado o produto Peptivet®, que tem o AMP2041 na sua constituição com uma concentração muito menor (0,5 µg/ml), facto que pode explicar a discrepância entre os resultados obtidos.

Por outro lado, no estudo de Ghibaudo et al. (2016), onde também foi avaliada a capacidade inibitória do Peptivet® relativamente a isolados de *P. aeruginosa*, foi possível concluir que este produto apresentou a capacidade de erradicar todos os isolados após 30 minutos de exposição, sendo que este resultado também não é concordante com o obtido neste estudo.

Assim, a baixa eficácia apresentada pelo Peptivet® relativamente aos isolados de *P. aeruginosa* testados pode estar relacionada com o facto de estes apresentarem a capacidade de produzir biofilme, ao contrário dos isolados utilizados nos estudos acima mencionados. De facto, no estudo de Cabassi et al. (2017) foi incluído um isolado com capacidade de formar biofilme, tendo os autores constatado que o AMP2041 apresentava uma menor atividade antimicrobiana relativamente a este isolado, o que apoia esta hipótese.

As células bacterianas organizadas sob a forma de biofilmes são menos suscetíveis à ação de compostos antimicrobianos do que na sua forma planctónica (Pye et al. 2013). A formação de biofilme protege fisicamente as bactérias contra altas concentrações de antimicrobianos, particularmente contra os que são formados por grandes moléculas polares (por exemplo, aminoglicosídeos), bem como contra péptidos antimicrobianos, contribuindo para a sua sobrevivência em ambientes hostis dentro do hospedeiro. A resistência antimicrobiana está relacionada com dificuldades na difusão de antibióticos através do biofilme, com a baixa atividade metabólica das bactérias presentes nas camadas internas, e com mudanças fisiológicas no seu modo de crescimento, incluindo a presença de células persistentes, nas quais a morte celular programada se encontra inativada (Oliveira et al. 2006; Pye et al. 2013; Ghibaudo et al. 2016).

A maioria dos protocolos de tratamento antimicrobiano estabelecidos foram desenvolvidos com base na farmacocinética e farmacodinâmica da atividade antimicrobiana contra células bacterianas planctónicas, e por isso não é certo se esses protocolos são igualmente eficazes no tratamento de infeções crónicas associadas a biofilmes bacterianos.

Para estes casos, segundo Msken et al. (2018), a eficácia do tratamento antimicrobiano depende da natureza e concentração do antibiótico; da aplicação como monoterapia ou terapia combinada; da duração do tratamento; e especialmente dos intervalos de tempo entre administrações. Neste estudo, a comparação dos resultados obtidos após 30 minutos e 24 horas de incubação dos isolados na presença de Peptivet<sup>®</sup> parece sugerir que, tal como descrito por Msken et al. (2018), a diminuição dos intervalos de tempo entre duas administrações de Peptivet<sup>®</sup> na prática clínica pode permitir a eliminação completa da infeção através da supressão da multiplicação das bactérias do biofilme.

Uma forma de ampliar o espectro de atividade dos agentes antimicrobianos é combinar a sua aplicação com um adjuvante (Chan, Khazandi, et al. 2019). Neste estudo procurou-se mimetizar o protocolo de tratamento utilizado na prática clínica para o tratamento de otites em cães, tendo-se avaliado o efeito de uma aplicação de uma solução de limpeza de constituição semelhante a um produto comercial (Otodine<sup>®</sup>), nomeadamente clorhexidina e Tris-EDTA, previamente aos compostos antimicrobianos testados. O Peptivet<sup>®</sup> e a clorhexidina apresentam um modo de ao semelhante, podendo ter um efeito sinérgico. Ambos os compostos são de natureza catinica e ligam-se fortemente às bactérias danificando a superfície da membrana celular (Guardabassi et al. 2010; Chan, Khazandi, et al. 2019). O Tris-EDTA, outro composto comumente encontrado em soluções de limpeza auricular, ajuda na remoção de resíduos do ouvido, na redução da carga microbiana e aumenta a suscetibilidade dos agentes patognicos à terapia antimicrobiana tpica em casos de OE canina. Este composto provoca danos na membrana celular de bactérias de Gram-negativo, induzindo a libertação dos lipopolissacridos e permitindo uma melhor penetração do agente antimicrobiano nas células bacterianas (Chan, Khazandi, et al. 2019). Neste ensaio, a aplicação prévia da solução de lavagem pode ter contribuído para aumentar a eficácia do Peptivet<sup>®</sup>, apesar deste já ter incluído clorhexidina e Tris-EDTA na sua composição. Observou-se que a solução de lavagem utilizada por si são não teve capacidade de erradicar nenhum dos isolados.

Relativamente à ação adjuvante do Tris-EDTA, esta também  observada na sua aplicação conjunta com outros compostos antimicrobianos. Um estudo por Song et al. (2020) revelou que a combinação de óleo essencial de Manuka com Tris-EDTA tem efeitos antibacterianos sinérgicos contra espécies de bactérias de Gram-negativo, incluindo isolados de *P. aeruginosa*, independentemente dos padrões de resistência aos antibióticos, e que diminui significativamente a concentração mínima inibitória (CMI) e a concentração mínima bactericida (CME). De facto, os óleos essenciais, como lavanda, alecrim e óleo de malaleuca, têm sido usados para vários fins medicinais devido às suas propriedades antimicrobianas, inseticidas e antioxidantes (Song et al. 2020). Um estudo por Sim et al. (2019) mostrou que

os óleos essenciais de orégãos e tomilho e os seus respetivos compostos fenólicos apresentaram atividade antimicrobiana contra 20 isolados de *P. aeruginosa*, possibilitando a erradicação de todos os isolados após apenas 1h de incubação. Pelo contrário, num estudo por Nogueira et al. (2008), isolados de *P. aeruginosa* foram resistentes a todos os óleos essenciais testados, incluindo óleo de camomila, hortelã, erva-doce e cravo-da-índia, sendo que a ação inibitória do Óleo de Lavanda não foi avaliada. A resistência das bactérias de Gram-negativo à ação dos óleos essenciais pode dever-se à complexidade da sua dupla camada na membrana celular (Quendera et al. 2019).

Neste estudo, o Óleo de Lavanda exibiu a melhor eficácia (61,5%) após 30 minutos de incubação, comparativamente aos outros antimicrobianos testados, tendo apresentado aproximadamente o dobro da eficácia do Peptivet®. A não concordância destes resultados com os dos estudos acima referidos pode dever-se à utilização de técnicas laboratoriais distintas e avaliação de concentrações diferentes de óleos.

Sobre o Óleo de Lavanda utilizado é importante referir que é um produto cosmético vendido em ervanárias e parafarmácias e que, apesar de ser 100% puro e de origem natural, ainda não é um produto aprovado para uso terapêutico em animais de companhia. Portanto, seria importante a realização de outros estudos com vista à avaliação da estabilidade e longevidade do efeito antimicrobiano do Óleo de Lavanda, bem como o pH, concentração ideal, armazenamento e ototoxicidade, de modo a garantir a sua aplicação clínica segura.

Segundo Mahlapuu et al. (2016), a atividade dos péptidos antimicrobianos é influenciada pelo pH, osmolaridade do meio e temperatura e, portanto, pode encontrar-se diminuída *in vivo* devido à presença de fluidos biológicos, comparativamente a condições *in vitro*. Embora o ensaio em microplaca de 96 poços realizado neste estudo seja amplamente utilizado para a avaliação da capacidade inibitória de compostos antimicrobianos, é claramente um sistema artificial que não pode mimetizar adequadamente a complexidade do microambiente de um ouvido inflamado, podendo constituir uma representação errónea do potencial terapêutico dos antimicrobianos *in vivo*. É muito pouco provável que a suscetibilidade demonstrada pelas espécies bacterianas *in vitro* seja semelhante à *in vivo*, devido ao facto de as concentrações de antimicrobianos aplicadas topicamente chegarem a ser entre 100 a 1000 vezes superiores às existentes nos discos dos testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (Jacobson 2002; Drenkard 2003). Além disso, previamente à administração de antimicrobianos, o conduto auditivo é muitas vezes sujeito a formulações de limpeza e antissépticos e limpeza mecânica, que promovem a alteração do microambiente do conduto, o que pode não ser possível representar em laboratório.

Neste ensaio foram obtidos alguns resultados não expectáveis. Como mostra a tabela 6, o isolado 8, previamente caracterizado como resistente relativamente à Gentamicina, foi erradicado após 24 horas de incubação com este antimicrobiano na concentração de 1505

UI/ml, igual à aplicada na prática clínica. O isolado 9, que demonstrou resistência intermédia à Gentamicina foi também erradicado após 30 minutos e após 24 horas de incubação na presença deste antimicrobiano na concentração de 1505 UI/ml.

**Tabela 6 - Perfil de resistência à Gentamicina dos isolados em estudo**

<b>NÚMERO</b>	<b>CÓDIGO DOS ISOLADOS</b>	<b>PERFIL DE RESISTÊNCIA À GENTAMICINA</b>
1	37/16	Sensível
2	47/16	Sensível
3	56/16	Sensível
4	235/16	Sensível
5	312/16	Sensível
6	475/17(1)	Sensível
7	475/17(2)	Sensível
8	413/18(1)	Resistente
9	413/18(3)	Intermédio
10	71/19	Sensível
11	96/19	Sensível
12	151/19	Sensível

Segundo o EUCAST (European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing) desde 2019 os isolados com perfil de resistência intermédio devem ser classificados como suscetíveis a exposição aumentada (Susceptible, Increased exposure). A exposição é uma função da influência do modo de administração, dose, intervalo de dosagem, tempo de infusão, distribuição e excreção do agente antimicrobiano relativamente ao organismo presente no local da infeção. De acordo com a nova definição do EUCAST, um microrganismo é classificado como suscetível a exposição aumentada por existir uma alta probabilidade de sucesso terapêutico quando a exposição do agente patogénico ao antimicrobiano é superior devido ao aumento da sua concentração no local da infeção e/ou através de alterações nos intervalos da administração (EUCAST 2019).

Estes resultados mostram que a aplicação tópica de um antimicrobiano numa concentração adequada para o tratamento de otites externas pode ser eficaz, apesar de os isolados responsáveis pela infeção apresentarem um perfil de resistência ou um perfil intermédio no TSA.

### **3.3 Estabelecimento de um modelo *in vitro* de cerúmen de cão e avaliação do seu impacto na atividade antimicrobiana do Peptivet® relativamente a biofilmes de *P. aeruginosa***

O cerúmen é uma mistura complexa de queratinócitos descamados e detritos com secreções de glândulas ceruminosas e sebáceas do conduto auditivo externo (Stahl et al. 2013; Lecchi et al. 2020). Em ouvidos saudáveis, o cerúmen contribui para a proteção do

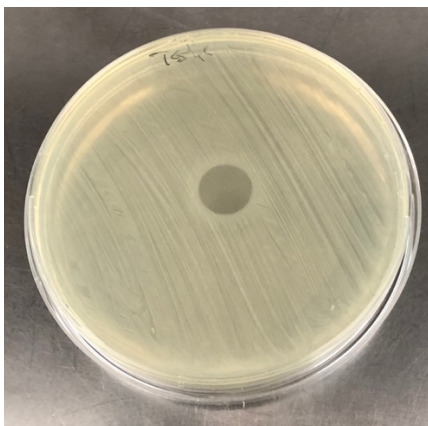
revestimento do epitélio cutâneo servindo como lubrificante, repelente de água e local de retenção para substâncias estranhas como pó ou pólen. Em otites externas, a quantidade de cerúmen produzida aumenta, enquanto o conteúdo lipídico e a hidrofobicidade diminuem, o que por sua vez leva à falha na sua função de barreira natural (Masuda et al. 2000; Stahl et al. 2013; Ehling et al. 2018; Lecchi et al. 2020).

A capacidade de penetração de diferentes antimicrobianos tópicos varia consoante as regiões do corpo, como resultado das diferenças na espessura do estrato córneo, densidade dos folículos pilosos, fricção e outras diferenças locais tais como a presença de cerúmen (Ehling et al. 2018). O aumento da presença de cerúmen no conduto auditivo infetado pode resultar na diluição do composto antimicrobiano e interferir com a eficácia do mesmo (Guardabassi et al. 2010). Por isso, o tratamento tópico apenas deve ser realizado após remoção mecânica e química do cerúmen com produtos de limpeza adequados. No entanto, mesmo após limpeza pelo médico veterinário, o cerúmen pode permanecer no conduto auditivo externo e assim reduzir a efetividade do tratamento (Stahl et al. 2013; Ehling et al. 2018).

Tendo isto em consideração, o objetivo da última etapa deste estudo foi avaliar a interferência da presença de cerúmen na ação do Peptivet<sup>®</sup>, procurando avaliar como é que este produto antimicrobiano inovador e recente no mercado se comportaria em condições mais semelhantes às encontradas *in vivo*.

Para tal, foi preparado cerúmen sintético, tal como descrito por Stahl et al. (2013). Após o primeiro ensaio, foi possível observar que o Peptivet<sup>®</sup> apresentou uma eficácia de 100% na inibição da produção de biofilme e na erradicação dos biofilmes formados pelos isolados em estudo, contrariando os resultados obtidos na etapa anterior. Os resultados obtidos no segundo ensaio foram semelhantes, o que apoiou a hipótese de a falta de nutrientes no meio estar a inibir a multiplicação dos isolados em estudo. Deste modo, no terceiro ensaio procedeu-se à alteração da composição da suspensão aplicada nos poços da placa. Neste ensaio, em vez dos poços serem preenchidos com 50% de cerúmen sintético e 50% de Peptivet<sup>®</sup>, estes foram preenchidos com 25% de cerúmen, 25% de meio TSB+glucose e 50% de Peptivet<sup>®</sup>. No entanto, os resultados obtidos foram semelhantes aos dos dois ensaios anteriores, sugerindo que algum componente no cerúmen apresenta efeito inibitório relativamente aos isolados. Para descartar esta hipótese foi realizado um teste “spot-on-lawn” para avaliação da atividade inibitória de todos os componentes do cerúmen sintético. Após 24 horas de incubação a 37°C, foi possível observar que os triglicéridos deram origem a um halo de inibição no tapete bacteriano (Figura 16), sendo que os triglicéridos eram o componente mais abundante presente no cerúmen sintético, perfazendo mais de 50% da sua constituição.

Deste modo, foi possível concluir que é necessário otimizar a composição do modelo de cerúmen utilizado, uma vez que a composição do cerúmen sintético utilizado neste estudo dissimula a atividade inibitória dos compostos antimicrobianos em estudo.



**Figura 16 - Halo de inibição promovido pelos triglicéridos num tapete bacteriano produzido por um dos isolados de *P. aeruginosa* (original do autor)**

O estudo de Stahl et al. (2013) foi o primeiro a fornecer informações detalhadas sobre a composição lipídica do cerúmen canino em ouvidos saudáveis e em ouvidos com otite externa. Consequentemente, foi também o pioneiro no desenvolvimento de um cerúmen sintético canino, cuja composição foi baseada nos resultados obtidos relativamente às percentagens das classes de lípidos encontradas no cerúmen de cão com otite externa, para avaliação da atividade de difusão de oito preparações otológicas comerciais.

Uns anos mais tarde, em 2017, Ehling et al. também utilizaram este modelo de cerúmen sintético num estudo para avaliar o impacto deste na absorção de um composto antimicrobiano através da pele do conduto auditivo.

Nenhum dos dois estudos citados descreveu qualquer problema relacionado com a composição do modelo do cerúmen. No entanto, é de ressaltar que nestes ensaios o cerúmen sintético foi utilizado apenas para avaliar o seu impacto na difusão ou absorção de certos compostos antimicrobianos na pele. Não foi analisado o efeito antimicrobiano desses compostos e, portanto, não foi perceptível o possível efeito inibitório dos componentes do cerúmen sintético relativamente a estirpes bacterianas associadas com OE em cães.

## 4 Conclusões

O desenvolvimento de microrganismos resistentes a antimicrobianos, causado pelo uso impróprio destes compostos, é uma grande preocupação em termos de saúde pública, pressionando para o desenvolvimento de alternativas que possam contrabalançar ou substituir o uso de antimicrobianos convencionais.

A Medicina Veterinária oferece um campo atraente para o uso e desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas, devido ao vínculo estreito e ao impacto sanitário dos animais na saúde pública.

Neste estudo avaliou-se o potencial antimicrobiano de três compostos diferentes, nomeadamente Gentamicina, Peptivet® e Óleo essencial de Lavanda, utilizando um modelo *in vitro* de biofilme de *P. aeruginosa*.

Dos binómios antimicrobiano / tempo de incubação avaliados, os que apresentaram maior eficácia foram o Óleo essencial de Lavanda / 30 minutos, que demonstrou capacidade de inibir e erradicar os biofilmes formados por 61,5% dos isolados em estudo, e a Gentamicina / 24 horas, que demonstrou capacidade de inibir e erradicar os biofilmes formados por 100% dos isolados em estudo.

O Peptivet® apresentou a eficácia mais baixa, apresentando ser aproximadamente metade da eficácia do óleo após 30 minutos de incubação. Foi também o composto que apresentou maior discrepância relativamente à capacidade de inibição e de erradicação dos biofilmes de *P. aeruginosa*.

Os resultados deste estudo indicam que o Óleo essencial de Lavanda avaliado pode ser considerado uma alternativa inovadora com grande potencial para o tratamento e prevenção de otites externas por *P. aeruginosa* no cão, sugerindo a necessidade de continuar esta linha de investigação com o objetivo da sua utilização futura em contexto clínico.

## 5 Limitações do estudo

Este estudo teve algumas limitações nomeadamente na composição *in vitro* do cerúmen sintético que apresentou um efeito inibitório em relação aos isolados de *P. aeruginosa* e a inexistência de estudos com composições alternativas.

Apesar de se terem obtido resultados promissores em relação ao Óleo de Lavanda, o facto de este tema estar em crescente desenvolvimento e de não existirem ainda muitos estudos acerca da sua utilização dificultou a comparação dos resultados obtidos com outros estudos pré-existentes.

Também ocorreu dificuldade na comparação dos resultados obtidos com a Gentamicina e o Peptivet® com os de outros estudos *in vitro*, devido ao facto da maioria dos estudos disponíveis avaliarem bactérias na forma planctónica e não sob a forma de biofilme.



Por fim, o facto de este estudo apenas ter utilizado isolados de *P. aeruginosa* formadores de biofilme, provenientes de amostras do conduto auditivo de cães com otite externa, limitou o número total de isolados disponíveis para o ensaio.

## 6 Perspetivas futuras

Estudos futuros poderão investigar os componentes genéticos de isolados caninos de *P. aeruginosa* que possam contribuir para a formação de biofilmes. A compreensão mais detalhada dos mecanismos envolvidos na formação de biofilme pelos isolados e a sua suscetibilidade aos antimicrobianos é importante a fim de entender a fisiopatologia das infeções associadas ao biofilme e para o desenvolvimento de medidas preventivas e de tratamento adequadas.

Para além destes métodos qualitativos, seria importante a realização de estudos quantitativos que permitissem determinar valores absolutos para as densidades ópticas dos biofilmes nas microplacas com tampas de pinos, de modo a ser possível tratar os dados estatisticamente e determinar se os resultados de cada composto utilizado seriam ou não significativos.

Também seria relevante realizar a caracterização do Óleo de Lavanda com vista à sua aprovação enquanto fórmula terapêutica comercializável para utilização no conduto auditivo em cães. Apesar dos amplos efeitos antibacterianos, antivirais e anti-inflamatórios do Óleo de Lavanda, pouco se sabe sobre os seus efeitos quando aplicado topicamente. Para tal, sugere-se a realização de outros ensaios *in vitro* tais como a avaliação da citotoxicidade e de viabilidade do OL após diferentes períodos e condições de armazenamento. Por fim, será necessário a realização de ensaios *in vivo* em indivíduos da espécie canina de forma a investigar a segurança otológica na sua administração, incluindo danos à membrana timpânica e efeitos adversos no nervo auditivo, e para garantir que a eficácia demonstrada neste estudo se mantém nas condições ambientais do conduto auditivo do cão.

Por fim, a reformulação da composição de um cerúmen sintético canino, utilizando compostos que não possuam efeitos inibitórios relativamente aos isolados, poderá permitir a realização de estudos *in vitro* que melhor mimetizam o ambiente do conduto auditivo externo no cão.

## Bibliografia

- Alhazmi A. 2015. *Pseudomonas aeruginosa* – Pathogenesis and Pathogenic Mechanisms. *Int J Biol.* 7(2):44–67. doi:10.5539/ijb.v7n2p44.
- Angus JC. 2004a. Otic cytology in health and disease. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 34(2):411–424. doi:10.1016/j.cvsm.2003.10.005.
- Angus JC. 2004b. Otic cytology in health and disease. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 34(2):411–424. doi:10.1016/j.cvsm.2003.10.005.
- Arai H. 2011. Regulation and function of versatile aerobic and anaerobic respiratory metabolism in *Pseudomonas aeruginosa*. *Front Microbiol.* 2(MAY):1–13. doi:10.3389/fmicb.2011.00103.
- Arais LR, Barbosa A V., Carvalho CA, Cerqueira AMF. 2016. Antimicrobial resistance, integron carriage, and *gyrA* and *gyrB* mutations in *Pseudomonas aeruginosa* isolated from dogs with otitis externa and pyoderma in Brazil. *Vet Dermatol.* 27(2):113-e31. doi:10.1111/vde.12290.
- August JR. 1988. Otitis externa. A disease of multifactorial etiology. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 18(4):731–742. doi:10.1016/S0195-5616(88)50076-1.
- Bahar AA, Ren D. 2013. Antimicrobial peptides. *Pharmaceuticals.* 6(12):1543–1575. doi:10.3390/ph6121543.
- Baltzer SA, Brown MH. 2011. Antimicrobial peptides-promising alternatives to conventional antibiotics. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 20(4):228–235. doi:10.1159/000331009.
- Baniya B, Pant N, Neupane S, Khatiwada S, Yadav U, Bhandaria N, Khadka R, Bhatta S, Chaudhary R. 2017. Biofilm and metallo beta-lactamase production among the strains of *Pseudomonas aeruginosa* and *Acinetobacter* spp. at a Tertiary Care Hospital in Kathmandu, Nepal. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* DOI 10.1186/s12941-017-0245-6.
- Barnard N, Foster A. 2017. *Pseudomonas* otitis in dogs: A general practitioner's guide to treatment. *In Pract.* 39(9):386–398. doi:10.1136/inp.j892.
- Barnard N, Foster A. 2018. How to treat *Pseudomonas* otitis in dogs. *Vet Rec.* 182(4):109–110. doi:10.1136/vr.k413.
- Batoni G, Maisetta G, Esin S. 2016. Antimicrobial peptides and their interaction with biofilms of medically relevant bacteria. *Biochim Biophys Acta - Biomembr.* 1858(5):1044–1060. doi:10.1016/j.bbamem.2015.10.013. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbamem.2015.10.013>.
- Bechinger B, Gorr SU. 2017. Antimicrobial Peptides: Mechanisms of Action and Resistance. *J Dent Res.* 96(3):254–260. doi:10.1177/0022034516679973.
- Biover: Aromaterapia Lavanda. c2021. Bélgica: Biover; [acedido em 2021 Mar 20]. <https://www.biover.pt/pt-PT/biover/product-detail/lavanda/187/>
- Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJV. 2015. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nat Rev Microbiol.* 13(1):42–51. doi:10.1038/nrmicro3380.
- Buckley LM, Mcewan NA, Nuttall T. 2013. Tris-EDTA significantly enhances antibiotic

efficacy against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* in vitro. *Vet Dermatol.* 24(5). doi:10.1111/vde.12071.

Cabassi CS, Sala A, Santospirito D, Alborali GL, Carretto E, Ghibaud G, Taddei S. 2017. Activity of AMP2041 against human and animal multidrug resistant *Pseudomonas aeruginosa* clinical isolates. *Ann Clin Microbiol Antimicrob.* 16(1):1–9. doi:10.1186/s12941-017-0193-1.

Cardoso MH, Orozco RQ, Rezende SB, Rodrigues G, Oshiro KGN, Cândido ES, Franco OL. 2020. Computer-Aided Design of Antimicrobial Peptides: Are We Generating Effective Drug Candidates? *Front Microbiol.* 10(January):1–15. doi:10.3389/fmicb.2019.03097.

Cavanagh HMA, Wilkinson JM. 2005. Lavender essential oil: a review. *Aust Infect Control.* 10(1):35–37. doi:10.1071/hi05035.

Chan WY, Hickey EE, Page SW, Trott DJ, Hill PB. 2019. Biofilm production by pathogens associated with canine otitis externa, and the antibiofilm activity of ionophores and antimicrobial adjuvants. *J Vet Pharmacol Ther.* 42(6):682–692. doi:10.1111/jvp.12811.

Chan WY, Khazandi M, Hickey EE, Page SW, Trott DJ, Hill PB. 2019. In vitro antimicrobial activity of seven adjuvants against common pathogens associated with canine otitis externa. *Vet Dermatol.* 30(2):133-e38. doi:10.1111/vde.12712.

Chatterjee M, Anju CP, Biswas L, Kumar VA, Mohan CG. 2015. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa* and alternative therapeutic options. *Int J Med Microbiol.* 306(1): 48-58. doi: 10.1016/j.ijmm.2015.11.004.

Coatesworth J. 2011. Causes of otitis externa in the dog. *Companion Anim.* 16(6):35–38. doi:10.1111/j.2044-3862.2011.00085.x.

Cole LK. 2004. Otoscopic evaluation of the ear canal. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 34(2):397–410. doi:10.1016/j.cvsm.2003.10.004.

Cole LK. 2009. Anatomy and physiology of the canine ear. *Vet Dermatol.* 20(5–6):412–421. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00849.x.

de Sousa LP, da Silva AF, Calil NO, Oliveira MG, da Silva SS, Raposo NRB. 2011. In vitro inhibition of *Pseudomonas aeruginosa* adhesion by xylitol. *Brazilian Arch Biol Technol.* 54(5): 877-884. doi: 10.1590/S1516-89132011000500004.

Dias DA, Urban S, Roessner U. 2012. A Historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites.* 2(2):303–336. doi:10.3390/metabo2020303.

Donlan RM. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8(9):881–890. doi:10.3201/eid0809.020063.

Drenkard E. 2003. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Microbes Infect.* 5(13):1213–1219. doi:10.1016/j.micinf.2003.08.009.

Duarte A, Tavares L. 2015. Novel Therapeutic Strategies in Veterinary Medicine. In: Oliveira M, Serrano I, editors. *Frontiers in Antimicrobial Agents. The Challenges of Antibiotic Resistance in the Development of New Therapeutics. Volume 1.* Lisboa: Bentham Science Publishers. p.234-260.

- Džidić S, Šušković J, Kos B. 2008. Antibiotic resistance mechanisms in bacteria: Biochemical and genetic aspects. *Food Technol Biotechnol.* 46(1):11–21.
- Ebani VV, Nardoni S, Bertelloni F, Pistelli L, Mancianti F. 2018. Antimicrobial activity of five essential oils against bacteria and fungi responsible for urinary tract infections. *Molecules.* 23(7):1–12. doi:10.3390/molecules23071668.
- Ebani VV, Nardoni S, Bertelloni F, Tosi G, Massi P, Pistelli L, Mancianti F. 2019. In vitro antimicrobial activity of essential oils against salmonella enterica serotypes enteritidis and typhimurium strains isolated from poultry. *Molecules.* 24(5). doi:10.3390/molecules24050900.
- Ehling S, Baynes RE, Bäumer W. 2018. Impact of synthetic canine cerumen on in vitro penetration of auricular skin of dogs by florfenicol, terbinafine, and betamethasone acetate. *Am J Vet Res.* 79(3):333–341. doi:10.2460/ajvr.79.3.333.
- El abed S, Ibsouda koraichi S, Latrache H, Zineb G, Mouradi H, Remmal A. 2011. Carvacrol and thymol components inhibiting *Pseudomonas aeruginosa* adherence and biofilm formation. *African J Microbiol Res.* 5(20):3229–3232. doi:10.5897/ajmr11.275.
- EUCAST. 2019. New definitions of S, I and R from 2019. [acedido em 2021 Jun 17]. <https://www.eucast.org/newsiandr/>
- European Commission. 2017. A European One Health Action Plan against Antimicrobial resistance (AMR). [acedido em 2021 Abr 10]. [https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/antimicrobial\\_resistance/docs/amr\\_2017\\_action-plan.pdf](https://ec.europa.eu/health/sites/default/files/antimicrobial_resistance/docs/amr_2017_action-plan.pdf)
- Ferreira CCCMT. 2010. Bombas de efluxo em *Pseudomonas* Importância clínica *Pseudomonas aeruginosa* efflux pumps. 6(February 2014):66–71.
- Freeman DJ, Falkiner FR, Patrick S. 1989. FREEMAN; FALKINER; KEANE, 1989.pdf. *J Clin Pathol.*:872–874.
- Gellatly SL, Hancock REW. 2013. *Pseudomonas aeruginosa*: New insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis.* 67(3):159–173. doi:10.1111/2049-632X.12033.
- Ghibaudo G, Santospirito D, Sala A, Flisi S, Taddei S, Cavirani S, Cabassi CS. 2016. In vitro antimicrobial activity of a gel containing antimicrobial peptide AMP2041, chlorhexidine digluconate and Tris-EDTA on clinical isolates of *pseudomonas aeruginosa* from canine otitis. *Vet Dermatol.* 27(5):1–6. doi:10.1111/vde.12371.
- Glaze MB. 2013. Diseases of Eyelids, Claws, Anal Sacs, and Ears. In: Miller WH, Griffin CE, Campbell KL. Muller and Kirk's Small Animal Dermatology. 7ª edição. Elsevier. P.743-767.
- Gorr SU, Abdolhosseini M. 2011. Antimicrobial peptides and periodontal disease. *J Clin Periodontol.* 38(SUPPL. 11):126–141. doi:10.1111/j.1600-051X.2010.01664.x.
- Grassi L, Di Luca M, Maisetta G, Rinaldi AC, Esin S, Trampuz A, Batoni G. 2017. Generation of persister cells of *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* by chemical treatment and evaluation of their susceptibility to membrane-targeting agents. *Front Microbiol.* 8(OCT):1–12. doi:10.3389/fmicb.2017.01917.
- Grono, LR (1970). Studies of the microclimate of the external auditory canal in the dog I: Aural temperature. *Research in Veterinary science* 11, 307-311.

Grono LR (1970b). Studies of the microclimate of the external auditory canal in the dog III: Relative humidity within the external auditory meatus. *Research in Veterinary science* 11, 316-319.

Grono, LR (1970c). Studies of the microclimate of the external auditory canal in the dog II: Hydrogen Ion concentration of the external auditory meatus in the dog. *Research in Veterinary Science* 11, 312-315.

Guardabassi L, Schwarz S, Lloyd DH. 2004. Pet animals as reservoirs of antimicrobial-resistant bacteria. *J Antimicrob Chemother.* 54(2):321–332. doi:10.1093/jac/dkh332.

Guardabassi L, Ghibaudo G, Damborg P. 2010. In vitro antimicrobial activity of a commercial ear antiseptic containing chlorhexidine and Tris-EDTA. *Vet Dermatol.* 21(3):282–286. doi:10.1111/j.1365-3164.2009.00812.x.

Guilhelmelli F, Vilela N, Albuquerque P, Derengowski L da S, Silva-Pereira I, Kyaw CM. 2013. Antibiotic development challenges: The various mechanisms of action of antimicrobial peptides and of bacterial resistance. *Front Microbiol.* 4(DEC):1–12. doi:10.3389/fmicb.2013.00353.

Haney EF, Mansour SC, Hancock REW. 2017. Antimicrobial peptides: An introduction. *Methods Mol Biol.* 1548:3–22. doi:10.1007/978-1-4939-6737-7\_1.

Harvey RG, Paterson S. 2014. Otitis externa : an essential guide to diagnosis and treatment.

Heine PA. 2004. Anatomy of the ear. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 34(2):379–395. doi:10.1016/j.cvsm.2003.10.003.

Henriques ST, Melo MN, Castanho MARB. 2006. Cell-penetrating peptides and antimicrobial peptides: How different are they? *Biochem J.* 399(1):1–7. doi:10.1042/BJ20061100.

iCF. AMP2041 The Evolution of Knowledge. 2016. Paper presented at: 8<sup>th</sup> World Congress of Veterinary Dermatology, Bordeaux

Jacobson LS. 2002. Diagnosis and medical treatment of otitis externa in the dog and cat. *Tydskr.S.Afr.vet.Ver.* 73(4): 162–170

Kavanaugh NL, Ribbeck K. 2012. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. And *Staphylococcus aureus* biofilms. *Appl Environ Microbiol.* 78(11):4057–4061. doi:10.1128/AEM.07499-11.

Keren I, Kaldalu N, Spoering A, Wang Y, Lewis K. 2004. Persister cells and tolerance to antimicrobials. *FEMS Microbiol Lett.* 230(1):13–18. doi:10.1016/S0378-1097(03)00856-5.

König HE, Hans-Georg Liebich. 2016. Anatomia dos Animais Domésticos - 6ed: Texto e Atlas Colorido. [https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=Vi1fDAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&ots=wVjzN3yARa&sig=gx-gjSLiinaeJJKLHjfkpuZw2o0&redir\\_esc=y#v=onepage&q&f=false](https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=Vi1fDAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PR1&ots=wVjzN3yARa&sig=gx-gjSLiinaeJJKLHjfkpuZw2o0&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false).

Kowalski JJ. 1988. The microbial environment of the ear canal in health and disease. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 18(4):743–754. doi:10.1016/S0195-5616(88)50077-3. [http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616\(88\)50077-3](http://dx.doi.org/10.1016/S0195-5616(88)50077-3).

Lecchi C, Zamarian V, Borriello G, Galiero G, Grilli G, Caniatti M, D'Urso ES, Roccabianca P, Perego R, Minero M, et al. 2020. Identification of Altered miRNAs in Cerumen of Dogs Affected by Otitis Externa. *Front Immunol.* 11(May):1–13. doi:10.3389/fimmu.2020.00914.

Lei J, Sun LC, Huang S, Zhu C, Li P, He J, Mackey V, Coy DH, He QY. 2019. The antimicrobial peptides and their potential clinical applications. *Am J Transl Res.* 11(7):3919–3931.

Lewis K. 2008. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322:107–131. doi:10.1007/978-3-540-75418-3\_6.

Lewis K. 2010. Persister cells. *Annu Rev Microbiol.* 64:357–372. doi:10.1146/annurev.micro.112408.134306.

Lister PD, Wolter DJ, Hanson ND. 2009. Antibacterial-resistant *Pseudomonas aeruginosa*: Clinical impact and complex regulation of chromosomally encoded resistance mechanisms. *Clin Microbiol Rev.* 22(4):582–610. doi:10.1128/CMR.00040-09.

Lupo A, Haenni M, Madec JY. 2018. Antimicrobial Resistance in *Acinetobacter* spp. and *Pseudomonas* spp.. *Microbiol Spectrum.* 6(3):ARBA-0007-2017.

Magiorakos AP, Srinivasan A, Carey RB, Carmeli Y, Falagas ME, Giske CG, Harbarth S, Hindler JF, Kahlmeter G, Olsson-Liljequist B, et al. 2012. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug-resistant bacteria: An international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clin Microbiol Infect.* 18(3):268–281. doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03570.x>.

Mahlapuu M, Håkansson J, Ringstad L, Björn C. 2016. Antimicrobial peptides: An emerging category of therapeutic agents. *Front Cell Infect Microbiol.* 6(DEC):1–12. doi:10.3389/fcimb.2016.00194.

Mariana NS, Salman AS, Neela V, Zamberi S. 2009. Evaluation of modified Congo red agar for detection of biofilm produced by clinical isolates of methicillin–resistance *Staphylococcus aureus*. *African Journal of Microbiology Research.* 3(6):330-338.

Maruhashi E, Braz BS, Nunes T, Pomba C, Belas A, Duarte-Correia JH, Lourenço AM. 2016. Efficacy of medical grade honey in the management of canine otitis externa - a pilot study. *Vet Dermatol.* 27(2):93-e27. doi:10.1111/vde.12291.

Masuda A, Sukegawa T, Mizumoto N, Tani H, Miyamoto T, Sasai K, Baba E. 2000. Study of Lipid in the Ear Canal in Canine Otitis Externa with *Malassezia pachydermatis*. *J Vet Med Sci.* 62(11):1177–1182. doi:10.1292/jvms.62.1177.

Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. 2010. *Medical Microbiology.* 6ª edição. Elsevier Ltda.

Müsken M, Pawar V, Schwebs T, Bähre H, Felgner S, Weiss S, Häussler S. 2018. Breaking the vicious cycle of antibiotic killing and regrowth of biofilm-residing *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* doi:10.1128/AAC.01635-18

Morris DO, Davis MF, Palmeiro BS, O'Shea K, Rankin SC. 2017. Molecular and epidemiological characterization of canine *Pseudomonas* otitis using a prospective case-control study design. *Vet Dermatol.* 28(1):118-e25. doi:10.1111/vde.12347.

MSD Veterinary Manual. 2020. Louisiana State University: Michelle Woodward; [atualizado em 2020 Oct; aceso em 2021 Jan 5]. <https://www.msdvetmanual.com/ear-disorders/otitis-externa/otitis-externa-in-animals?redirectid=2884>

Ngo J, Taminiu B, Fall PA, Daube G, Fontaine J. 2018. Ear canal microbiota – a comparison between healthy dogs and atopic dogs without clinical signs of otitis externa. *Vet Dermatol.* 29(5):425-e140. doi:10.1111/vde.12674.

Njaa BL, Cole LK, Tabacca N. 2012. Practical Otic Anatomy and Physiology of the Dog and Cat. *Vet Clin North Am - Small Anim Pract.* 42(6):1109–1126. doi:10.1016/j.cvsm.2012.08.011.

Nogueira JCR, Diniz M de FM, Lima EO. 2008. In vitro antimicrobial activity of plants in Acute Otitis Externa. *Braz J Otorhinolaryngol.* 74(1):118–124. doi:10.1016/s1808-8694(15)30761-8.

Nuttall T. 2016. Successful management of otitis externa. *In Pract.* 38(May):17–21. doi:10.1136/inp.i1951.

Nuttall T, Cole LK. 2007. Evidence-based veterinary dermatology: A systematic review of interventions for treatment of *Pseudomonas* otitis in dogs. *Vet Dermatol.* 18(2):69–77. doi:10.1111/j.1365-3164.2007.00575.x.

Nuttall TJ. 1998. Use of ticarcillin in the management of canine otitis externa complicated by *Pseudomonas aeruginosa*. *J Small Anim Pract.* 39(4):165–168. doi:10.1111/j.1748-5827.1998.tb03624.x.

Oliveira M, Bexiga R, Nunes SF, Carneiro C, Cavaco LM, Bernardo F, Vilela CL. 2006. Biofilm-forming ability profiling of *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* mastitis isolates. *Vet Microbiol.* 118(1–2):133–140. doi:10.1016/j.vetmic.2006.07.008.

Pang Z, Raudonis R, Glick BR, Lin TJ, Cheng Z. 2019. Antibiotic resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: mechanisms and alternative therapeutic strategies. *Biotechnol Adv.* 37(1):177–192. doi:10.1016/j.biotechadv.2018.11.013. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.11.013>.

Paterson S. 2016. Topical ear treatment – options, indications and limitations of current therapy. *J Small Anim Pract.* 57(12):668–678. doi:10.1111/jsap.12583.

Peptivet oto gel, gel otológico eudermico formulato per cani e gatti. Itália: Nirvana & WordPress; [aceso em 2021 Mar 5]. <https://www.icfpet.info/prodotti/otologici/peptivet-oto/>

Pericolini E, Colombari B, Ferretti G, Iseppi R, Ardizzoni A, Girardis M, Sala A, Peppoloni S, Blasi E. 2018. Real-time monitoring of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation on endotracheal tubes in vitro. *BMC Microbiol.* 18(1):1–10. doi:10.1186/s12866-018-1224-6.

Petrov V, Mihaylov G, Tsachev I, Zhelev G, Marutsov P, Koev K. 2013. Otitis externa in dogs: Microbiology and antimicrobial susceptibility. *Rev Med Vet (Toulouse).* 164(1):18–22.

Phoenix DA, Dennison SR, Harris F. 2013. Antimicrobial Peptides: Their History, Evolution, and Functional Promiscuity. *Antimicrob Pept.*:1–37. doi:10.1002/9783527652853.ch1.

Pletzer D, Coleman SR, Hancock REW. 2016. Anti-biofilm peptides as a new weapon in antimicrobial warfare. *Curr Opin Microbiol.* 33:35–40. doi:10.1016/j.mib.2016.05.016. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mib.2016.05.016>.

Pletzer D, Hancock REW. 2016. Antibiofilm peptides: Potential as broadspectrum agents. *J Bacteriol.* 198(19):2572–2578. doi:10.1128/JB.00017-16.

Pye CC, Yu AA, Weese JS. 2013. Evaluation of biofilm production by *Pseudomonas aeruginosa* from canine ears and the impact of biofilm on antimicrobial susceptibility in vitro. *Vet Dermatol.* 24(4):1–6. doi:10.1111/vde.12040.

Quendera AP, Barreto AS, Semedo-Lemsaddek T. 2019. Antimicrobial activity of essential oils against foodborne multidrug-resistant enterococci and aeromonads in planktonic and biofilm state. *Food Sci Technol Int.* 25(2):101–108. doi:10.1177/1082013218799027.

Rasamiravaka T, Labtani Q, Duez P, El Jaziri M. 2015. The formation of biofilms by *pseudomonas aeruginosa*: A review of the natural and synthetic compounds interfering with control mechanisms. *Biomed Res Int.* 2015. doi:10.1155/2015/759348.

Rewatkar AR. 2013. *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*- Biofilm formation Methods. *IOSR J Pharm Biol Sci.* 8(5):36–40. doi:10.9790/3008-0853640.

Ribeiro SO, Fontaine V, Mathieu V, Zhiri A, Baudoux D, Stévigny C, Souard F. 2020. Antibacterial and cytotoxic activities of ten commercially available essential oils. *Antibiotics.* 9(10):1–17. doi:10.3390/antibiotics9100717.

Romani AA, Baroni MC, Taddei S, Ghidini F, Sansoni P, Cavirani S, Cabassi CS. 2013. In vitro activity of novel in silico-developed antimicrobial peptides against a panel of bacterial pathogens. *J Pept Sci.* 19(9):554–565. doi:10.1002/psc.2532.

Sampath VP. 2018. Bacterial endotoxin-lipopolysaccharide; structure, function and its role in immunity in vertebrates and invertebrates. *Agric Nat Resour.* 52(2):115–120. doi:10.1016/j.anres.2018.08.002. <https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.08.002>.

dos Santos I de AL, Nogueira JM da R, Mendonça FCR. 2015. Mecanismos de resistência antimicrobiana em *pseudomonasaeruginosa* TT - Mechanisms responsible for antimicrobial resistance in *pseudomonas aeruginosa*. *Rev bras anal clin.* 47(1–2):5–12. <https://www.arca.fiocruz.br/bitstream/icict/15160/3/RBAC%0A47%0A-%0A1-2%0A2015%0Aref.%0A272.pdf>.

Saridomichelakis MN, Farmaki R, Leontides LS, Koutinas AF. 2007. Aetiology of canine otitis externa: A retrospective study of 100 cases. *Vet Dermatol.* 18(5):341–347. doi:10.1111/j.1365-3164.2007.00619.x.

Serrano I. 2015. Antimicrobial Peptides. In: Oliveira M, Serrano I, editors. *Frontiers in Antimicrobial Agents. The Challenges of Antibiotic Resistance in the Development of New Therapeutics.* Volume 1. Lisboa: Bentham Science Publishers. p.33-68.

Serrano I, Oliveira M, Santos JP, Bilocq F, Leitão A, Tavares L, Pirnay JP, De Vos D. 2017. Antimicrobial resistance and genomic rep-PCR fingerprints of *Pseudomonas aeruginosa* strains from animals on the background of the global population structure. *BMC Vet Res.* 13(1):1–8. doi:10.1186/s12917-017-0977-8.

Sienkiewicz M, Glowacka A, Kowalczyk E, Wiktorowska-Owczarek A, Józwiak-



Bębenista M, Łysakowska M. 2014. The biological activities of cinnamon, geranium and lavender essential oils. *Molecules*. 19(12):20929–20940. doi:10.3390/molecules191220929.

von Silva-Tarouca MSE, Wolf G, Mueller RS. 2019. Determination of minimum inhibitory concentrations for silver sulfadiazine and other topical antimicrobial agents against strains of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from canine otitis externa. *Vet Dermatol*. 30(2):145-e42. doi:10.1111/vde.12718.

Sim JXF, Khazandi M, Chan WY, Trott DJ, Deo P. 2019. Antimicrobial activity of thyme oil, oregano oil, thymol and carvacrol against sensitive and resistant microbial isolates from dogs with otitis externa. *Vet Dermatol*. 30(6):524-e159. doi:10.1111/vde.12794.

Song D, Meng J, Cheng J, Fan Z, Chen P, Ruan H, Tu Z, Kang N, Li N, Xu Y, et al. 2019. Through Cell Surface Lipid Domain Dissolution. *Nat Microbiol*. 4(January). doi:10.1038/s41564-018-0290-8. <http://dx.doi.org/10.1038/s41564-018-0290-8>.

Song SY, Hyun JE, Kang JH, Hwang CY. 2020. In vitro antibacterial activity of the manuka essential oil from *Leptospermum scoparium* combined with Tris-EDTA against Gram-negative bacterial isolates from dogs with otitis externa. *Vet Dermatol*. 31(2):81–85. doi:10.1111/vde.12807.

Stahl J, Mielke S, Pankow WR, Kietzmann M. 2013. Ceruminal diffusion activities and ceruminolytic characteristics of otic preparations - an in-vitro study. *BMC Vet Res*. 9. doi:10.1186/1746-6148-9-70.

Sun J, Deng Z, Yan A. 2014. Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. *Biochem Biophys Res Commun*. 453(2):254–267. doi:10.1016/j.bbrc.2014.05.090. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2014.05.090>.

Sweeney MT, Lubbers B V., Schwarz S, Watts JL. 2018. Applying definitions for multidrug resistance, extensive drug resistance and pandrug resistance to clinically significant livestock and companion animal bacterial pathogens. *J Antimicrob Chemother*. 73(6):1460–1463. doi:10.1093/jac/dky043.

Tabacca NE, Cole LK, Hillier A, Rajala-Schultz PJ. 2011. Epithelial migration on the canine tympanic membrane. *Vet Dermatol*. 22(6):502–510. doi:10.1111/j.1365-3164.2011.00982.x.

Tariq S, Wani S, Rasool W, Shafi K, Bhat MA, Prabhakar A, Shalla AH, Rather MA. 2019. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. *Microb Pathog*. 134(March). doi:10.1016/j.micpath.2019.103580.

Toke O. 2005. Antimicrobial peptides: New candidates in the fight against bacterial infections. *Biopolym - Pept Sci Sect*. 80(6):717–735. doi:10.1002/bip.20286.

Topa SH, Subramoni S, Palombo EA, Kingshott P, Rice SA, Blackall LL. 2018. Cinnamaldehyde disrupts biofilm formation and swarming motility of *pseudomonas aeruginosa*. *Microbiol (United Kingdom)*. 164(9):1087–1097. doi:10.1099/mic.0.000692.

Viegas C, Da Silva Bolzani V, Barreiro EJ. 2006. The natural products and the modern medicinal chemistry. *Quim Nova*. 29(2):326–337. doi:10.1590/s0100-40422006000200025.

Villavicencio RT. 1998. The history of blue pus. *J Am Coll Surg*. 187(2):212–216.

doi:10.1016/S1072-7515(98)00137-9.

Wang G, Li X, Wang Z. 2016. APD3: The antimicrobial peptide database as a tool for research and education. *Nucleic Acids Res.* 44(D1):D1087–D1093. doi:10.1093/nar/gkv1278.

World Health Organization (WHO). 2017. Stop using antibiotics in healthy animals to prevent the spread of antibiotic resistance. [acedido em 2021 May 4]. <https://www.who.int/news/item/07-11-2017-stop-using-antibiotics-in-healthy-animals-to-prevent-the-spread-of-antibiotic-resistance>

World Health Organization (WHO). 2018. Critically Important Antimicrobials for Human Medicine, 6th revision, Ranking of medically important antimicrobials for risk management of antimicrobial resistance due to non-human use. [acedido em 2021 May 28]. <https://www.who.int/publications/i/item/9789241515528>

Yap PSX, Yiap BC, Ping HC, Lim SHE. 2014. Essential Oils, A New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *Open Microbiol J.* 8(1):6–14. doi:10.2174/1874285801408010006.

Zhao X, Wu H, Lu H, Li G, Huang Q. 2013. LAMP: A Database Linking Antimicrobial Peptides. *PLoS One.* 8(6):6–11. doi:10.1371/journal.pone.0066557.

## Anexos

Anexo 1 - Perfil de resistências dos isolados utilizados no estudo e respetivo ano de recolha

<b>Código dos Isolados</b>	37/16	47/16	56/16	235/16	312/16	475/17- 1	475/17 - 2	413/18 - 1	413/18 - 1 3	71/19	96/19	151/19
<b>Fármaco testado</b>												
Amox + Ac. Clavulânico	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Ampicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Cloranfenicol	R	R	-	-	R	R	R	R	R	-	-	-
Ciprofloxacina	S	S	S	S	S	S	I	S	I	S	S	S
Cefalexina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Gentamicina	S	S	S	S	S	S	S	R	I	S	S	S
Cefotaxima	I	I	R	R	I	I	R	R	R	I	R	I
Enrofloxacina	I	R	R	R	I	S	I	I	I	I	I	I
Estreptomicina	I	R	R	R	R	I	I	R	R	I	-	-
Sulfametoxazol + Trimetropim	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Tetraciclina	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
Amicacina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Carbenicilina	R	R	R	R	R	R	R	R	S	-	-	-
Ceftazidima	S	S	S	I	S	-	-	R	R	S	S	S
Cefoperazona	I	I	R	I	S	I	I	R	R	S	S	S
Oflaxacina	S	S	S	I	S	S	S	S	S	S	S	S
Piperacilina	S	S	S	S	S	S	S	R	R	S	S	-
Tobramicina	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ácido Nalidíxico	R	-	R	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Marbofloxacina	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	S
<b>Ano de Recolha</b>	16	16	16	16	16	17	17	18	18	19	19	19