

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DE MANJERICÃO, ALECRIM E CAPIM
LIMÃO SOBRE AGENTES CAUSADORES DE ENDOMETRITE
EM ÉGUAS**

FERNANDO PAIXÃO LISBOA

BOTUCATU – SP
ABRIL 2021

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA

**AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DE MANJERICÃO, ALECRIM E CAPIM
LIMÃO SOBRE AGENTES CAUSADORES DE ENDOMETRITE
EM ÉGUAS**

FERNANDO PAIXÃO LISBOA

Tese apresentada junto ao Programa
de Pós-Graduação em Biotecnologia
Animal para obtenção do título de
Doutor.

Orientador: Prof. Dr. José Antônio
Dell’Aqua Júnior.

BOTUCATU – SP
ABRIL 2021

FICHA CATALOGRÁFICA

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM. DIVISÃO TÉCNICA
DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Lisboa, Fernando Paixão.

Avaliação da capacidade antimicrobiana in vitro dos óleos essenciais de manjeriço, alecrim e capim limão sobre agentes causadores de endometrite em éguas / Fernando Paixão Lisboa. - Botucatu, 2021

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia

Orientador: José Antônio Dell'Aqua Junior

Capes: 50504002

1. Éguas - Doenças. 2. Endometrite. 3. Resistência microbiana a medicamentos. 4. Medicamentos fitoterápicos. 5. Óleos essenciais.

Palavras-chave: Endometrite; Fitoterápicos; Óleos essenciais; Resistência microbiana.

Nome do autor: Fernando Paixão Lisboa

Título: AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIMICROBIANA *in vitro* DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE MANJERICÃO, ALECRIM E CAPIM LIMÃO SOBRE AGENTES CAUSADORES DE ENDOMETRITE EM ÉGUAS

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. José Antônio Dell’Aqua Júnior

Presidente e Orientador

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP
– Botucatu

Prof. Dr. Frederico Ozanam Papa

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP
– Botucatu

Prof. Dr. Marco Antônio Alvarenga

Membro

Departamento de Reprodução Animal e Radiologia Veterinária FMVZ – UNESP
– Botucatu

Dr. Marcio Teoro do Carmo

Membro

Médico Veterinário Autônomo

Prof. Dr. Gabriel Fernandes Pauletti

Membro

Instituto de Biotecnologia – Laboratório de Óleos Essenciais – UCS – Caxias do Sul/RS

Data da Defesa: 23 de abril de 2021.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho ao meu filho Gabriel, que todo esforço e dedicação sirvam de inspiração para suas escolhas futuras.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer à Deus, por me permitir seguir evoluindo e lutando pelos meus sonhos.

À minha esposa Duda, pelo apoio incondicional e por acreditar em todos os meus projetos de vida.

Ao meu filho Gabriel, que nasceu no meio deste trabalho, e sempre me esperou com um sorriso no rosto toda vez que voltei depois de um período ausente.

Ao meu orientador, Prof. Dr. José Antônio Dell'Aqua Junior, pela amizade, confiança em mim depositada, e por todo conhecimento compartilhado.

À Universidade de Caxias do Sul, que me disponibilizou toda a sua estrutura para que eu pudesse realizar meu experimento.

Aos meus colegas de pós-graduação, em especial ao Lorenzo, Guilherme e Rafael, que me deram todo o suporte necessário para que eu pudesse me manter fora de Botucatu durante este período.

Aos meus alunos, em especial à Carol, Mariana, Gabriel e Jéssica, que de alguma forma me apoiaram para que eu pudesse realizar este trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para que este trabalho pudesse ter sido realizado.

LISTA DE ABREVIATURAS

PMNs: polimorfonucleados;

IA: inseminação Artificial;

EPPC: endometrite persistente pós-cobertura;

LPS: lipopolissacarídeos;

DNA: ácido desoxirribonucleico;

RNA: ácido ribonucleico;

OE: óleo essencial;

SUMÁRIO

	Página
CAPÍTULO 1.....	10
1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA.....	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	13
2.1 ENDOMETRITE.....	13
2.1.1 Endometrite não infecciosa.....	14
2.1.2 Endometrite Infecciosa.....	15
2.1.3 Terapias comumente utilizadas.....	18
2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA.....	20
2.2.1 Antimicrobianos.....	22
2.2.1.1 <i>Inibição da síntese de parede celular</i>	23
2.2.1.2 <i>Prejuízo à função da membrana</i>	24
2.2.1.3 <i>Inibição da ação do ácido nucleico</i>	24
2.2.1.4 <i>Inibição da síntese de proteínas</i>	24
2.2.2 Tipos de resistência bacteriana.....	25
2.2.2.1 <i>Resistência construtiva ou intrínseca</i>	26
2.2.2.2 <i>Resistência adquirida</i>	26
2.2.2.3 <i>Resistência adaptativa</i>	27
2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	27
2.3.1 Biossíntese dos óleos essenciais.....	28
2.3.1.1 <i>Terpenos e terpenóides</i>	29
2.3.1.2 <i>Fenilpropanóides</i>	30
2.3.2 Ação Antimicrobiana dos óleos essenciais.....	30
2.3.3 Óleo essencial de Manjeriçã.....	32
2.3.4 Óleo essencial de Alecrim.....	32
2.3.5 Óleo essencial de Capim-Limão.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	34
HIPÓTESE.....	40
OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	40
CAPÍTULO 2.....	41
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	69

RESUMO

A endometrite consiste em um processo inflamatório do endométrio que pode ser agudo ou crônico, clínico ou subclínico, infeccioso ou não infeccioso. Na espécie equina a endometrite é considerada uma das principais causas de queda de fertilidade, morte embrionária e abortos, gerando relevantes prejuízos econômicos. Dentre os agentes microbianos causadores de infecções uterinas na espécie equina, os mais encontrados são bactérias e fungos, sendo a endometrite bacteriana a causa mais frequente de infertilidade em éguas. As bactérias comumente isoladas em casos de endometrite são: *Streptococcus equi zooepidemicus*; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. As endometrites fúngicas são normalmente ocasionadas pela *Candida Albicans*. As infecções fúngicas são oportunistas, estando muitas vezes relacionadas à queda de imunidade dos indivíduos, tornando seu tratamento um desafio. Para as infecções bacterianas, a principal forma de tratamento é a antibioticoterapia, podendo esta ser intrauterina ou parenteral. No entanto, a resistência bacteriana associada a antimicrobianos tem aumentado em função de mecanismos de sobrevivência desenvolvidos por estes patógenos e pela utilização indiscriminada de fármacos. Este uso indiscriminado também favorece o desenvolvimento fúngico, e não é raro a ocorrência simultânea destas afecções. Desta forma, novas alternativas de tratamento vêm sendo estudadas. Compostos naturais apresentam baixa probabilidade de geração ou seleção de resistência devido a sua complexidade química e forma de ação; além disso, são comuns na natureza. Diversos estudos têm demonstrado o potencial antimicrobiano de óleos essenciais, entretanto, mais estudos são necessários para o entendimento de quais compostos são realmente eficazes neste processo, visto que muitos fatores abióticos podem interferir na produção de metabólitos secundários pelas plantas. O objetivo desta revisão é abordar informações sobre endometrite, resistência bacteriana, óleos essenciais e seu potencial antimicrobiano.

Palavras-chave: Endometrite, fitoterápicos, óleos essenciais, resistência bacteriana.

ABSTRACT

Endometritis is an endometrial inflammatory process that can be acute or chronic, clinical or subclinical, infectious or non-infectious. In the equine industry, endometritis is considered one of the main causes of decreased fertility, embryonic death and abortions, generating significant economic losses. Among the microbial agents that cause uterine infections in the equine species, the most commonly found are bacteria and fungi, with bacterial endometritis being the most frequent cause of infertility in mares. The bacteria commonly isolated in cases of endometritis are: *Streptococcus equi zooepidemicus*; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. Fungal endometritis is usually caused by *Candida Albicans*. Fungal infections are opportunistic and are often related to individual immunity decrease, making treatment a challenge. For bacterial infections, antibiotics are the main treatment, which can be intrauterine or parenteral application. However, antimicrobials bacterial resistance has increased due to the survival mechanisms developed by these pathogens and the indiscriminate use of these drugs. This indiscriminate use also favors fungal development, and it is not uncommon they simultaneously occurrence. Thus, new treatment alternatives have been studied. Natural compounds have a low probability of generating or selecting resistance due to their chemical complexity and form of action; moreover, they are common in nature. Several studies have demonstrated the antimicrobial potential of essential oils, however, more studies are needed to understand which compounds are really effective in this process, since many abiotic factors can interfere with the production of secondary metabolites by plants. The purpose of this review is to address information about endometritis, bacterial resistance, essential oils and their antimicrobial potential.

Key-words: Endometritis, phytotherapeutics, bacterial resistance, essential oils.

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO E JUSTIFICATIVA

A endometrite é a maior causa de infertilidade em éguas, podendo ser de origem infecciosa ou não infecciosa (COLBERN et al., 1987). O processo não infeccioso é atribuído principalmente pela resposta imunológica desenvolvida na presença do sêmen equino, sendo considerado um quadro fisiológico, conhecido como endometrite pós-cobertura, nestes animais (TROEDSSON, 2011). Entretanto, a endometrite infecciosa é decorrente de uma falha nos mecanismos de defesa uterina, possibilitando o estabelecimento de fungos e bactérias no local (FERRIS, 2016).

As principais bactérias causadoras de endometrite em éguas são *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Staphylococcus* spp., *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020). Já, os principais fungos são *Candida* spp. e *Aspergillus* spp. (COUTINHO-SILVA; ALVARENGA, 2011).

Os tratamentos para endometrite variam conforme a etiologia, entretanto, consistem inicialmente na lavagem uterina, possibilitando a remoção do muco desenvolvido pela inflamação exacerbada (SCOTT, 2018). Contudo, quando de origem infecciosa, a lavagem uterina deve ser associada à agentes antibióticos e antifúngicos capazes de impedir o desenvolvimento microbiológico (LEBLANC, 2009; SCOTT, 2018).

Com o aumento da resistência aos agentes antimicrobianos, cada vez mais se fazem necessárias alternativas capazes de atuar frente aos microrganismos (FAO, 2016). O estabelecimento da resistência desenvolvida pelos fungos e bactérias é atribuído a um aumento da função celular, capaz de manter o nível energético necessário, ainda que, estes patógenos estejam expostos aos agentes antimicrobianos (COURVALIN, 2008).

Atualmente existem mais de 9 mil plantas conhecidas por suas propriedades medicinais, sendo utilizadas na indústria alimentícia e farmacêutica (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016). Através destas plantas, extrai-se óleos oriundos de folhas, flores, cascas e raízes, sendo estes óleos conhecidos como óleos essenciais (REDDY, 2019). Os óleos essenciais apresentam atividades

antioxidantes, analgésicas, anti-inflamatórias, antibacterianas e antifúngicas (TELES-ANDRADE et al., 2014).

Esta revisão reúne informações sobre endometrite e suas principais terapias, mecanismos de ação dos antibióticos, mecanismos de resistência bacteriana, óleos essenciais e suas características que os conferem atividade antimicrobiana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ENDOMETRITE

A endometrite é considerada a maior causa de infertilidade em éguas, ocasionando grandes perdas econômicas na indústria do cavalo (COLBERN et al., 1987; LEBLANC; CAUSEY, 2009). Esse quadro é gerado pela incapacidade das defesas uterinas em eliminar produtos inflamatórios e microrganismos, podendo ser classificada em infecciosa e não infecciosa (TROEDSSON, 2011). Esta incapacidade pode ocorrer por diferentes fatores, associados ou não, tais como: defeitos anatômicos da genitália, contração miometrial diminuída, drenagem linfática e limpeza mucociliar insuficientes, lesões cervicais e degenerações vasculares (LEBLANC; CAUSEY, 2009).

A principal resposta imunológica desencadeada a partir de endométrio equino ocorre durante a fase folicular do ciclo estral, quando são observados maiores níveis de estrógenos (COLBERN et al., 1987). Os neutrófilos, também conhecidos como polimorfonucleados (PMNs), são as primeiras células ativadas contra os estímulos inflamatórios do endométrio (LEHRER et al., 1988).

Os sinais clínicos da endometrite incluem acúmulo de fluido intrauterino, secreção vaginal, vaginite, encurtamento do ciclo estral, entre outros. No entanto, estes sinais podem não estar presentes em casos subclínicos, os quais são pouco diagnosticados e geralmente atribuídos à éguas idosas e pluríparas, ainda que, possa acometer jovens e nulíparas (LEBLANC; CAUSEY, 2009).

O diagnóstico é realizado através da avaliação dos sinais clínicos, histórico reprodutivo, além de cultura, citologia e biópsia endometrial. Segundo Nielsen (2005), a infiltração de neutrófilos no epitélio luminal e estrato compacto endometrial é o diagnóstico “padrão ouro” para endometrite em éguas. Neste estudo, foram comparados os resultados de swab e citologia endometrial com swab de fragmentos de biópsia, os quais apresentaram sensibilidade de 0.34, 0.77 e 0.82, respectivamente.

Desta forma, é necessário considerar a possibilidade de falsos negativos em culturas endometriais realizadas com swab protegido devido à baixa sensibilidade da técnica. Para isso, LeBlanc et al. (2007) demonstrou que o uso

de lavados uterinos de baixo volume aumentam a sensibilidade da técnica de cultura e citologia endometrial para 0.71 e 0.8, respectivamente.

Existem diferentes métodos para o diagnóstico citológico de endometrite, entretanto em um estudo realizado por Walter et al. (2012), observou-se que a escova citológica apresenta os melhores resultados, sendo capaz de coletar material para um maior número de esfregaços a serem realizados. Além disso, a avaliação ultrassonográfica é importante para avaliar presença de fluido intrauterino e edema exacerbado (FERRIS, 2016).

2.1.1 Endometrite Não Infecciosa

A endometrite pós-cobertura é uma situação fisiológica das éguas, onde ocorre uma resposta inflamatória gerada pela presença de sêmen no trato reprodutivo da fêmea (TROEDSSON, 2011). Antigamente, acreditava-se que a esta patologia era exclusivamente infecciosa, entretanto, alguns estudos relatam que o mecanismo de defesa celular é igualmente desencadeado na presença de espermatozoides ou salina (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020; KATILA, 1996; TROEDSSON, 2011).

Em éguas saudáveis, classificadas como resistentes, este processo inflamatório é debelado em até 48 horas após cobertura ou inseminação artificial (IA), não sendo observado sinais de inflamação endometrial após este período. Nos casos onde o processo inflamatório ultrapassa as 96 horas, está caracterizado um quadro de endometrite persistente pós-cobertura (EPPC), sendo estas éguas classificadas como susceptíveis (KATILA, 1996).

Perdas embrionárias precoces são três vezes maiores em éguas com esta condição quando comparado a éguas saudáveis (MALSCHITZKY et al., 2003), sendo uma importante causa de perdas econômicas na indústria equestre.

O tratamento EPPC baseia-se basicamente na limpeza do acúmulo de fluido e produtos inflamatórios do útero em até 96 horas pós cobertura ou IA (KATILA, 1996), promovendo um ambiente uterino adequado até a chegada do embrião entre o dia 5 e 6 pós ovulação (CARD, 2005). Para isso, são administradas drogas ecbólicas como a ocitocina, realizam-se lavagens uterinas

com ringer lactato, acrescido ou não de substâncias antissépticas, ou aplicação de corticosteroides previamente à IA (BUCCA et al., 2008; DELL AQUA JR. et al., 2006; PYCOCK, 2006).

2.1.2 Endometrite Infeciosa

As endometrites infecciosas são causadas principalmente por bactérias e normalmente estão associadas às éguas susceptíveis com inflamações persistentes (TROEDSSON, 2011). As fêmeas equinas apresentam basicamente três mecanismos responsáveis pelas defesas uterinas contra endometrite infecciosa: barreiras físicas do trato reprodutor; imunidade inata e contratilidade uterina (LEBLANC; CAUSEY, 2009). Entretanto, quando são incapazes de realizar algum destes mecanismos, desenvolvem a patologia.

Além das bactérias, alguns fungos podem causar endometrite de forma oportunista, colonizando inicialmente a vagina e aparelho reprodutor externo promovendo uma contaminação ascendente até o útero. Alguns fatores como a má conformação perineal, pneumovagina, excessiva manipulação uterina e uso indiscriminado de antibióticos favorecem a ocorrência da endometrite fúngica (COUTINHO-SILVA; ALVARENGA, 2011). Não é raro o crescimento concomitante de fungos e bactérias, sendo necessário a associação de tratamentos antifúngicos e antibacterianos nestes casos (FERRIS, 2017).

A infertilidade por três ciclos consecutivos, mesmo com o uso de garanhões férteis, associado a alterações anatômicas da genitália, fibroses e adesões cervicais, deficiência da contratilidade uterina, administração crônica de antibióticos intrauterinos, e baixo escore de condição corporal são alguns dos fatores de risco para o desenvolvimento de endometrite infecciosa (FERRIS, 2016).

As células epiteliais e estromais do endométrio equino possuem um papel principal na resposta inata frente a presença de lipopolissacarídeos (LPS), componente da parede de bactérias gram-negativas, o qual também prejudica as reações homeostáticas a secreção de citocinas e prostaglandinas (IBRAHIM et al., 2019). Além disso, o número de PMNs nas avaliações citológicas está diretamente relacionado ao isolamento de *Streptococcus* β -hemilítico,

demonstrando o efeito inflamatório exacerbado no endométrio equino causado pela presença de bactérias (WALTER et al., 2012).

Dentre as principais bactérias causadoras de endometrite em éguas encontram-se: *Streptococcus equi* spp. *zooepidemicus*, *Staphylococcus* spp. *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Klebsiella pneumoniae* (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020).

A aderência bacteriana na célula endometrial é o primeiro passo para o estabelecimento da infecção e parece ser facilitada pela presença de fimbrias nos microrganismos. Além disso, o estabelecimento patológico é facilitado pelos polissacarídeos presentes na cápsula bacteriana, que dificultam a fagocitose e produção de anticorpos contra as mesmas (WITTENBRINK; HOLZLE; BAUMEISTER, 1997).

O *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus* e o *Staphylococcus aureus* são as bactérias gram-positivas causadoras de endometrite em éguas, sendo a primeira a principal bactéria isolada no útero das fêmeas equinas (CANISSO; SEGABINAZZI; FEDORKA, 2020; FERRIS, 2016; TROEDSSON, 2011).

São diversos os fatores, além dos citados anteriormente, que podem predispor uma égua à estas infecções. Segundo Fu et al. (2017), deficiências nas concentrações de CD44, molécula transmembrana responsável pela expressão de diferentes células de defesa presentes na imunidade inata e adaptativa, tornaram ratos susceptíveis ao estabelecimento da infecção por *S. zooepidemicus*, além de alterar a disseminação e crescimento bacteriano. Em um estudo realizado por Preziuso, Moriconi e Cuteri (2019), observou-se uma alta heterogeneidade genética de *S. equi zooepidemicus* em amostras coletadas do trato reprodutivo e respiratório de equinos.

Dentre as principais bactérias gram-negativas causadoras de endometrite em éguas encontram-se *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, ambas capazes de produzir biofilme para manutenção da sobrevivência no epitélio reprodutivo, conferindo resistência a diferentes agentes antimicrobianos (FERRIS et al., 2016; MAHAL et al., 2020). O biofilme produzido por estes microrganismos atua como uma barreira física

capaz de impedir a atuação dos antibióticos no endométrio (LONCAR et al., 2017).

A endometrite fúngica é causada por dois principais microrganismos: *Candida* spp. (69%) e *Aspergillus* spp. (26%) (DASCANIO, 2007; COUTINHO-SILVA; ALVARENGA, 2011; BELTAIRE; CHEONG. COUTINHO-SILVA, 2012). Entretanto, apenas 1-5% dos casos de infertilidade nas fêmeas equinas é atribuído à endometrite fúngica (SCOTT, 2018). Aparentemente o estabelecimento desse tipo de patologia no organismo das éguas está correlacionado a utilização indiscriminada de antibióticos, pneumovagina e urovagina, além do acúmulo excessivo de fluido intrauterino (COUTINHO-SILVA; ALVARENGA, 2011).

Diversas éguas com mais de 11 anos, histórico de infertilidade e com cultura bacteriana positiva podem apresentar endometrite fúngica associada (DASCANIO, 2007). Segundo Dascanio (2007), dentre os fatores predisponentes para o estabelecimento de endometrite fúngica encontram-se imunossupressão, desnutrição, doenças endócrinas e alterações de microbiota causadas por tratamentos com antibióticos.

A endometrite fúngica geralmente ocorre através de uma infecção oportunista, onde ocorre uma proliferação primária dos fungos no trato reprodutivo caudal. Os sinais clínicos geralmente observados englobam secreção vaginal purulenta e excesso de fluido com aspecto “floculento” quando realizado exame ultrassonográfico (SCOTT, 2018).

A *Candida* spp. é um fungo comumente encontrado de forma comensal na mucosa oral, gastrointestinal e vaginal, sendo a *Candida albicans* a com maior capacidade de aderir-se ao epitélio vaginal quando comparada às demais espécies, estando o estrógeno envolvido, o qual facilita estas aderências epiteliais (DASCANIO, 2007).

Os antibióticos podem alterar a microflora através da destruição de *Lactobacillus* spp. prejudicando as defesas fisiológicas e estabelecendo um desequilíbrio que leva ao crescimento de *Candida* spp. (COUTINHO-SILVA; ALVARENGA, 2011). Conforme comprovado por Fraga e colaboradores (2008), os *Lactobacillus* e os *Enterococcus* spp. têm papel importante no controle da

flora vaginal de éguas, uma vez que são capazes de regular o crescimento de bactérias gram-negativas e positivas no trato reprodutivo das fêmeas.

2.1.3 Terapias comumente utilizadas

A abordagem terapêutica varia conforme a etiologia da endometrite, devendo observar-se as características individuais de cada égua ressaltando sua causa primária.

O tratamento da endometrite bacteriana consiste principalmente na aplicação intrauterina e/ou parenteral de antibióticos. A seleção do antibiótico a ser utilizado deve ser baseada na cultura microbiológica e testes de sensibilidade ao fármaco, ainda que, algumas respostas *in vitro* apresentem-se diferentes de resultados da aplicação clínica (LEBLANC, 2009).

A aplicação sistêmica dos antibióticos pode se fazer necessária nos casos crônicos de endometrite, ou ainda, quando se deseja estender o tratamento durante o diestro e minimizar a manipulação do trato reprodutor da fêmea (LEBLANC, 2009).

A lavagem uterina previamente à aplicação dos antibióticos é uma alternativa para melhorar a eficácia do tratamento, uma vez que, o exsudato presente no útero pode inativar ou diluir a infusão antibiótica além de minimizar o contato do fármaco com a superfície uterina, prejudicando as respostas contra os microrganismos (LEBLANC, 2009).

São diversas as moléculas e vias de aplicação de antibióticos utilizados no tratamento da endometrite, devendo o profissional estar constantemente atualizado frente às novas estratégias de tratamento.

Por exemplo, a utilização de ciprofloxacina foi testada por Trundell e colaboradores (2017), a fim de esclarecer a concentração inibitória mínima do fármaco a ser utilizada para o tratamento de endometrite bacteriana. Assim, 600 mg de ciprofloxacina administrada através de infusão intrauterina resultaram em absorção endometrial e intraluminal capaz de agir contra *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Streptococcus equi* subespécie *zooepidemicus*. Com isso, a ciprofloxacina é indicada no tratamento

de infecções uterinas causadas por bactérias gram-negativas que sejam resistentes a outros fármacos (TRUNDELL et al., 2017).

Já a infusão intrauterina de enrofloxacin foi descrita como altamente inflamatória, gerando severa necrose e fibrose endometrial, efeitos que a podem prejudicar a fertilidade das éguas (RODRIGUEZ et al., 2012). Entretanto, a utilização de uma solução aquosa de enrofloxacin durante 3 dias consecutivos causou apenas uma inflamação transitória da mucosa endometrial, sugerindo que tal fármaco pode ser utilizado na forma de solução aquosa contra bactérias resistentes aos demais antibióticos, sem causar danos ao endométrio (SCHNOBRICH et al., 2015).

Em um estudo realizado por Abou El-Amajem e colaboradores (2016) foi comparada a utilização entre diferentes antibióticos frente à endometrites causadas por *Streptococcus equi zooepidemicus*, onde observou-se que a administração intrauterina de ceftiofur teve o melhor resultado quando comparado ao tratamento com gentamicina 10% de forma intrauterina e ceftiofur de forma sistêmica.

Além da utilização de drogas antimicrobianas tradicionais, diversas substâncias são utilizadas como adjuvantes no tratamento da endometrite, podendo ser utilizadas associadas ou não aos antibióticos, as quais podem apresentar ação direta sobre os patógenos ou simplesmente potencializar o mecanismo de ação da droga.

Conforme relatado por Loncar et al. (2017) o dimetilsulfoxido foi capaz de tratar infecções causadas por *E.coli* e *K. pneumoniae*, entretanto, a utilização de ozônio e ácido hipocloroso não se demonstrou capaz atuar contra as bactérias gram-negativas, atuação prejudicada pela possibilidade do desenvolvimento de biofilme pelas mesmas, reduzindo o potencial antimicrobiano das drogas utilizadas. Já utilização de peróxido de hidrogênio foi descrita como capaz de auxiliar na ruptura do biofilme causado por algumas bactérias, entretanto, a ação varia conforme a cepa bacteriana (FERRIS et al., 2016).

O tratamento para endometrite fúngica é geralmente frustrante pela patologia geralmente estar relacionado ao status imunológico dos animais, além de ocorrer em éguas com agravantes relacionados, como serem pluríparas, com

má conformação perineal e incompetência cervical. Além disso, muitas destas fêmeas passam por diversos tratamentos errôneos com utilização de antibióticos (LEBLANC, 2009).

A associação de diferentes fatores deve ser abordada para proceder com o tratamento ideal para cada caso de endometrite fúngica de forma individual. A correção de defeitos anatômicos, lavagens uterinas e administração de antifúngicos sistêmicos ou de forma intrauterina, e ainda, administração tópica de antifúngicos em locais como a vagina e o clitóris onde geralmente pode servir de reservatório para estes microrganismos (SCOTT, 2018).

Alguns fármacos como nistatina, cetoconazol, fluconazol e anfotensina B foram relatados como eficientes contra *Candida* spp. (DASCANIO, 2009). Entretanto, com o aumento da resistência aos antifúngicos como fluconazol e miconazol nos últimos anos, cada vez mais se faz necessário testes de susceptibilidade dos microrganismos a fim de ter um melhor resultado nas fêmeas tratadas (BELTAIRE; CHEONG; COUTINHO-SILVA, 2012).

As lavagens uterinas podem auxiliar no tratamento, promovendo limpeza uterina pela remoção de muco excessivo e potenciais biofilmes, devendo ser consideradas a primeira linha de tratamento até que se obtenham os resultados da cultura e testes de sensibilidade (SCOTT, 2018). Dentre as soluções citadas pela literatura: N-acetilcisteína 20%, DMSO 20%, peróxido de hidrogênio 3%, ácido acético 2%, diluídos em solução salina 0,9% ou ringer, podem ser utilizadas neste processo (POTTZ; RAMPEY; BENJAMIN, 1967; SCOTT, 2018).

2.2 RESISTÊNCIA BACTERIANA

O desenvolvimento de resistência antimicrobiana em bactérias tem atingido níveis preocupantes em diversas partes do mundo, sendo este aumento atribuído à utilização indiscriminada de antimicrobianos tanto em medicina humana quanto em medicina veterinária, trazendo sérias ameaças a saúde pública e a segurança alimentar (FAO, 2016).

No meio ambiente os microrganismos constantemente competem por alimento e espaço, e para isso desenvolvem ou adquirem mecanismos adaptativos que lhes conferem vantagem para sobrevivência no ambiente.

Os antibióticos são substâncias naturalmente desenvolvidas por bactérias, fungos e leveduras que atuam, em pequenas doses, inibindo o crescimento de bactérias sem prejudicar o hospedeiro. Já os quimioterápicos são substâncias quimicamente modificadas que atuam de forma seletiva sobre o microrganismo. Estas substâncias são amplamente utilizadas no tratamento de infecções em humanos e animais.

O uso global de antibióticos com a finalidade de tratar animais é estimado em aproximadamente 50% do total consumido entre medicina humana e veterinária. Em medicina veterinária os antimicrobianos são utilizados em grande escala nos pets, animais de fazenda e na aquicultura. Na produção animal, os antimicrobianos são utilizados na profilaxia, metafilaxia e como promotores de crescimento, auxiliando na eficiência zootécnica dos rebanhos (TEUBER, 2001). A aplicação deste recurso na promoção de crescimento é realizada principalmente nas criações de suínos, bovinos, perus e frangos.

O desenvolvimento de resistência microbiana e a disseminação de genes ligados a resistência tem sido atribuída a pressão de seleção ocasionada pela exposição das bactérias patogênicas e comensais a doses baixas de antibióticos (sub-terapêuticas) por longos períodos de tempo. Este é um processo naturalmente encontrado em microrganismos, ocorrendo na presença ou ausência de antibióticos. O desenvolvimento de resistência confere ao microrganismo vantagem seletiva contra moléculas presentes no ambiente, propiciando um diferencial competitivo entre células bacterianas (FURUYA; LOWY, 2006).

A maioria dos antimicrobianos hoje utilizados para o tratamento de doenças são naturalmente produzidos por microrganismo presentes no solo. Inclusive, tem sido demonstrado que genes produtores de resistência em bactérias patogênicas são os mesmos encontrados em microrganismos que produzem o antibiótico (MARTÍNEZ; BAQUERO, 2009; BENVENISTE; DAVIS, 1973). Análises filogenéticas tem demonstrado que a evolução dos genes envolvidos na resistência antimicrobiana é anterior a “era dos antibióticos” (MARTINEZ; BAQUERO, 2009). Como exemplo, temos a resistência a penicilina por *Escherichia coli*, que foi identificada logo após sua descoberta e início da utilização clínica, por Abraham e Chain em 1940 (FAO, 2016).

No meio ambiente, a expressão de genes de resistência, apesar de não estar bem esclarecida, pode ter diferentes funções incluindo defesa contra produtos tóxicos, sinalizador de multiplicação celular, ou funções metabólicas (MARTINEZ; BAQUERO, 2009). A disseminação destes genes pode ser distribuída em três níveis, dependendo do vetor, sendo: disseminação clonal, que está relacionada com a replicação cromossomal bacteriana; conjugação e transferência plasmidial; e migração gênica com replicação de transposon (COURVALIN, 2008).

A exposição das bactérias a variações ambientais geradas pela intensificação das atividades humanas como a industrialização, urbanização e produção agropecuária em grande escala, certamente aumentaram a pressão de seleção a que estes microrganismos são expostos. Apesar de os meios de disseminação e transferência dos genes de resistência ainda não estar bem esclarecido, existe uma grande preocupação quanto a utilização de antimicrobianos na produção animal e a emergência de resistência nas infecções em humanos. As enterobactérias, tanto comensais quanto patogênicas representam grande preocupação na transferência de genes de resistência, pois podem facilmente realizar isso de forma horizontal adquirindo múltiplas resistências a fármacos clinicamente úteis (FAO, 2016).

2.2.1 Antimicrobianos

A utilização clínica de antimicrobianos teve seu início após a chamada “revolução antibiótica”. Em 1928, Fleming observou a ação inibitória do fungo *Penicillium notatum* no crescimento de *estafilococcus*. Posteriormente, Chain e Florey empenharam-se na investigação da penicilina como agente terapêutico, obtendo resultados práticos satisfatórios. Em 1935 foi descoberta a ação antimicrobiana das sulfonamidas, sendo posteriormente isolado o químico ativo. A partir de então houve o desenvolvimento de novas moléculas antibióticas (PRESCOTT, 2016). Em 1942, Walksman (apud TAVARES, 2001) define antibióticos como “substâncias produzidas por seres vivos, geralmente microscópicos, capazes de agir como tóxicos seletivos, em pequenas concentrações, sobre microrganismos”.

Apesar da maioria dos antibióticos serem produzidos por microrganismos, alguns são o resultado de modificações na estrutura química de moléculas pré-existentes. Há também substâncias antimicrobianas inteiramente sintéticas, além das produzidas a partir de plantas (BLACK, 1999). Os medicamentos antimicrobianos podem ter diversas classificações, tendo sua atuação baseada nas diferenças estruturais e bioquímicas do hospedeiro e do microrganismo, cada qual com sua importância clínica (PRESCOTT, 2016).

A utilização dos medicamentos antimicrobianos na medicina humana e animal foi possível principalmente pelas significativas diferenças estruturais e bioquímicas entre células eucarióticas e procarióticas, auxiliando na seletividade tóxica do medicamento. Uma das formas de classificar os medicamentos antimicrobianos é subdividi-los quanto ao seu mecanismo de ação frente ao agente: atuando na inibição da síntese da parede celular; causando prejuízo à função da membrana celular; provocando a inibição da síntese ou função do ácido nucleico; e inibindo a síntese proteica (PRESCOTT, 2016). Os mecanismos de ação dos antimicrobianos serão descritos a seguir.

2.2.1.1 Inibição da síntese de parede celular

A parede celular das bactérias é composta basicamente de peptidoglicanos unidos por ligações cruzadas entre peptídios (transpeptídios), tendo variação entre bactérias Gram positivas e negativas. A transpeptidase é uma enzima que catalisa a reação de transpeptidação responsável pela ligação entre peptídios (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Os antibióticos que interferem na função desta enzima e conseqüentemente na formação da parede celular incluem penicilinas e cefalosporinas (betalactâmicos), bacitracina e vancomicina. O bloqueio na síntese de peptidoglicano, enfraquece a parede celular, então facilitando a ação de autolisinas que lisam a parede celular. Deste modo, os medicamentos com esta função, são ativos somente em células que estão em multiplicação ativa (PRESCOTT, 2016).

2.2.1.2 Prejuízo à função da membrana

As membranas celulares encontram-se entre a parede celular e o citoplasma, controlando a permeabilidade da célula. Quando há prejuízo em sua função, o conteúdo celular pode extravasar ou substâncias adentrarem a célula, gerando lesão e morte. Os principais antibióticos que apresentam essa ação incluem polimixinas, monensina e polienos antifúngicos. As polimixinas ligam-se aos fosfolípidios da membrana desorganizando sua estrutura, resultando em lise celular (PRESCOTT, 2016).

2.2.1.3 Inibição da função do ácido nucleico

Os medicamentos que possuem este mecanismo de ação, normalmente atuam ligando-se ao DNA inibindo sua replicação ou transcrição. Seus alvos são a RNA polimerase dependente de DNA, a enzima DNA girase ou a enzima dihidropteroato sintetase. Estas formas de atuação causam, respectivamente, a inibição da síntese de RNA, o bloqueio da replicação e reparo do DNA, e o bloqueio da formação de cofatores do ácido fólico (sulfonamidas e trimetopima), importantes para síntese de ácidos nucleicos (GUIMARÃES; MOMESSO; PUPO, 2010). Os principais medicamentos que inibem a função dos ácidos nucleicos são quinolonas, novobiocina, rifampicina, sulfonamidas, trimetropima, 5-flucitosina, nitroimidazóis (metronidazol), nitrofuranos e ácido nalidíxico (PRESCOTT, 2016).

2.2.1.4 Inibição da síntese de proteínas

A inibição da síntese proteica ocorre pela ação dos fármacos nas subunidades 30S do ribossomo (aminoglicosídeos, tetraciclina) e os que atuam na subunidade 50S do ribossomo (macrolídeos, lincosamidas, estreptograminas, cloranfenicol). A seletividade na forma de ação destes medicamentos se dá pelas diferenças significativas na estrutura, composição e função dos ribossomos entre células procarióticas e eucarióticas (BLACK, 1999; PRESCOTT, 2016).

2.2.2 Tipos de resistência bacteriana

As bactérias podem ser naturalmente resistentes a certo grupo de antimicrobianos ou substância (resistência constitutiva/intrínseca), ou podem adquirir resistência frente a antimicrobianos através de diversos mecanismos (resistência adquirida).

Estão identificados cinco mecanismos que podem conferir a célula bacteriana resistência a um ou diversos antimicrobianos. Estes mecanismos podem ser organizados da seguinte forma: (1) modificação ou proteção do alvo do antimicrobiano, normalmente afetando o ribossomo bacteriano (fluoroquinolonas, rifampicina, vancomicina, penicilinas, macrolídeos, e aminoglicosídeos); (2) alteração da permeabilidade da membrana, que consiste na diminuição do acúmulo intracelular e/ou atividade de efluxo do antimicrobiano ocasionado por uma alteração na informação genica (fluoroquinolonas, aminoglicosídeos, tetraciclina, β -lactâmicos, e macrolídeos); (3) desenvolvimento e alta produção de enzimas alvo, é uma causa comum de resistência que pode destruir ou inativar agentes antimicrobianos (sulfonamidas, trimetoprima, β -lactâmicos); (4) alteração enzimática, que causa modificação ou degradação do antimicrobiano (β -lactâmicos, aminoglicosídeos, macrolídeos, rifampicina); (5) alteração da rota metabólica, ocorre pelo desenvolvimento de uma rota metabólica alternativa evitando a inibição celular (trimetoprima, sulfonamidas, vancomicina) (BLACK, 1999; FAO, 2016).

A aquisição da resistência a um ou mais agentes antimicrobianos geralmente está associado a um ganho de função celular, e conseqüentemente, determina um custo biológico. O número de cepas resistentes depende de alguns fatores com o tipo de antibiótico usado e concentração, além da capacidade da célula em manter o nível energético necessário para replicação. Uma mutação, evolução compensatória ou perda de material extra gênico pode ocorrer para reversão da resistência, ou aquisição de uma segunda mutação, assim, permitindo que a célula se torne novamente competitiva em relação a população natural (COURVALIN, 2008).

2.2.2.1 Resistência constitutiva ou intrínseca

A resistência constitutiva a alguns antimicrobianos é usualmente ligada a características fisiológicas ou anatômicas do microrganismo, normalmente por não apresentarem os mecanismos celulares necessários para a susceptibilidade ao antibiótico. Este mecanismo de resistência geralmente está presente em todos componentes de um gênero ou espécie o que delimita a ação dos antimicrobianos (COURVALIN, 2008). A resistência a Benzilpenicilina G, pelo gênero bacteriano *Mycoplasma*, é um exemplo pois estes não possuem parede celular (PRESCOTT, 2016).

2.2.2.2 Resistência adquirida

A resistência antimicrobiana adquirida ou geneticamente adquirida, pode surgir de duas formas: por mutações espontâneas nos cromossomos bacterianos (transmissão vertical) ou pela transferência gênica de bactéria para bactéria (transmissão horizontal). O mecanismo de mutação ocorre apenas em certos isolados, estando presente em alguns exemplares da mesma espécie ou gênero. A mutação cromossomal é relativamente rara porque ocorre em baixa frequência, porém, tem alta relevância para o desenvolvimento de resistência em clones bacterianos. Mutações podem afetar genes regulatórios ou alterar alvos de agentes antimicrobianos. Já na transferência horizontal os genes são transferidos de uma célula bacteriana para outra, independentemente de eventos reprodutivos (COURVALIN, 2008; FAO, 2016).

A transferência genica horizontal é considerada a maior causa de disseminação de genes de resistência entre populações bacterianas, tendo importância na medicina, tanto humana quanto veterinária (AARESTRUP; WEGENER; COLLIGNON, 2008). Este tipo de resistência normalmente é de alto nível, do tipo “tudo ou nada”, conferindo vantagem seletiva a sobrevivência do microrganismo frente aos antimicrobianos.

A transferência horizontal ocorre de três maneiras: transformação (aquisição de DNA livre, que se recombina durante a replicação de DNA originando novas formas de genes); conjugação (a disponibilização de DNA de um doador bacteriano para um receptor bacteriano, exige contato físico e

estruturas específicas); e transdução (consiste na mobilização de DNA de um doador bacteriano para um receptor bacteriano através de um bacteriófago) (AMÁBLILE-CUEVAS, 2012). Dependendo do tipo de transferência gênica horizontal, pode ocorrer a transmissão de uma resistência específica ou a combinação de genes inseridos em estruturas móveis como: genes cassetes incorporados em integrons, que podem ser incorporados a transposons, e transposons que podem ser integrados a plasmídios, gerando então resistência (MARTINEZ; BAQUERO, 2009; PRESCOTT, 2016).

Plasmídios são estruturas de DNA que podem conter transposons, e então ser transmitidas horizontal ou verticalmente através de clones bacterianos (COURVALIN, 2008). Alguns transposons mais complexos contêm integrons, que são compostos de um gene de integrase e de um local de ligação específico, onde a integrase pode incorporar “cassetes” de resistência a antibióticos, que são expressos a partir de um único promotor e causam resistência múltipla (LEVY; MARSHALL, 2004).

2.2.2.3 Resistência adaptativa

As diferentes condições ambientais as quais os microrganismos são expostos e as respostas a fatores estressores, podem conseqüentemente, levar a expressão e ativação de fenótipos relacionados a resistência antimicrobiana como atividade de bombas de efluxo e/ou diminuição da permeabilidade celular. A ativação destes sistemas desaparece quando o estímulo é retirado, assim diferenciando-se da resistência intrínseca (FAO, 2016).

2.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

A utilização de plantas e seus subprodutos como os óleos essenciais (OE) está descrita desde o início da humanidade, tendo importância na medicina humana e veterinária, promovendo a manutenção da saúde dos indivíduos (TELES-ANDRADE et al., 2014). Dependendo da espécie, estes óleos são extraídos de flores, folhas, cascas, raízes e frutos oriundos de plantas medicinais (REDDY, 2019).

Existem mais de nove mil plantas conhecidas por suas propriedades medicinais e aproximadamente mil e quinhentas identificadas por seu aroma e sabor. Atualmente, 80% da população mundial depende da utilização farmacológica relacionada às plantas medicinais, sendo utilizadas para tratar neoplasias, Alzheimer e afecções cardiovasculares, dentre outras aplicações (SWAMY; AKHTAR; SINNIHAH, 2016).

Os óleos essenciais são produtos compostos principalmente por substâncias de baixo peso molecular como álcoois, polifenóis, terpenóides e compostos carbonílicos, sendo utilizados na indústria alimentícia, cosmética e farmacêutica (CARVEIRO; QUEIROZ, 1993; REDDY, 2019).

Dentre as propriedades terapêuticas atribuídas aos OE, encontram-se sua ação antioxidante, analgésica, anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica e larvicida (TELES-ANDRADE et al., 2014; REDDY, 2019). Além disso, são utilizados na indústria cosmética na composição de fragrâncias e maquiagens (REDDY, 2019). Alguns componentes químicos presentes nos OE como oleorresinas são utilizados fixadores de fragrâncias, solventes e matéria-prima para produção de tintas (FELIPE; BICAS, 2017).

2.3.1 Biossíntese dos óleos essenciais

Os metabólitos produzidos pelas plantas se dividem em dois grupos: primário e secundário, sendo o primeiro, conhecidos como compostos que participam da nutrição e processos metabólicos essenciais, oriundo do processo de fotossíntese, originando e degradando macromoléculas. Já, o segundo, são micromoléculas que influenciam na interação entre as plantas e o ambiente gerando uma homeostasia (MONTANARI, 2010; PEREIRA; NASCIMENTO, 2014).

A síntese dos metabólitos secundários, os quais originam os OE, se dá por quatro rotas biossintéticas: via do acetato-malonato, via do ácido chiquímico, via do metileritritol fosfato e via do acetato-mevalonato (MONTANARI, 2010; SANTOS, 2015).

Após a fotossíntese e produção dos metabólitos primários, estes são direcionados às vias que originarão os metabólitos secundários. Assim, a via do

ácido chiquímico originará aminoácidos aromáticos, substâncias nitrogenadas e substâncias fenólicas. Já, a via do ácido malônico origina substâncias graxas e fenólicas, e as vias do ácido mevalônico e do metileritritol fosfato originam os terpenos e terpenóides (SANTOS, 2015).

A composição química dos OE é influenciada pela forma de cultivo da planta, pelos fatores ecológicos e genéticos, sendo possível observar-se uma variação entre a ação gerada pelos OE oriundos de uma mesma espécie de planta (STEFAN et al., 2013). A produção dos OE varia conforme a idade vegetal, temperatura ambiental, radiação, disponibilidade hídrica, nutrientes, estímulos mecânicos e luminosidade (PEREIRA; NASCIMENTO, 2014).

Os OE são considerados misturas complexas de diferentes componentes químicos, sendo geralmente formados principalmente por dois ou três compostos, os quais originam de 20-70% da sua fórmula, e demais componentes presentes em menores concentrações (REDDY, 2019).

A obtenção dos OE se dá pelo processo de destilação à vapor ou hidrodestilação, o qual origina um produto altamente volátil, com aspecto líquido, translúcido e raramente incolor, apresentando um forte aroma (TELES-ANDRADE et al., 2014; OJEDA-SENA et al., 2013; REDDY, 2019).

2.3.1.1 Terpenos e terpenóides

Os terpenos e terpenóides são biossinteticamente derivados do isopreno, distinguindo-se entre si pela presença de oxigênio nos terpenóides (REDDY, 2019; FELIPE; BICAS, 2017). São classificados pela quantidade de carbonos presentes na sua estrutura química, sendo divididos em hemiterpenos, monoterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, tetraterpenos e politerpenos (MONTANARI, 2010).

Quimicamente, os terpenos e terpenóides não apresentam uma função específica, entretanto, englobam funções de estruturas com hidrocarbonetos, álcoois e fenóis e são considerados alcenos naturais (FELIPE; BICAS, 2017). Segundo Pereira e Nascimento (2014), estes metabólitos secundários são principalmente encontrados nas plantas produtoras de OE, sendo os monotespenos 90% destes, como mirceno, geraniol e cânfora.

2.3.1.2 Fenilpropanóides

A cadeia dos fenilpropanóides é composta por um anel aromático de seis carbonos seguido por uma cadeia com três carbonos intercalados por uma ligação dupla e um grupo oxigenado (MONTANARI, 2010). Dentre as substâncias encontradas nessa classe estão cinamaldeído, acetato de cinamil, anetol e eugenol (PEREIRA; NASCIMENTO, 2014).

São produzidos através do ácido chiquímico, que reage com o fosfoenolpiruvato e forma o ácido corísmico, sendo esse capaz de gerar aminoácidos aromáticos como a tirosina e o triptofano (MARTINS, 2010).

2.3.2 Ação antimicrobiana dos óleos essenciais

Com a busca por alternativas eficientes no tratamento de infecções bacterianas, os estudos relacionando a utilização dos OE à atividade antimicrobiana são constantes (TELES-ANDRADE et al., 2014). É difícil atribuir à ação antimicrobiana de um OE apenas à um dos componentes, pois são geralmente formados por uma mistura de diferentes compostos químicos, a qual determina a efetividade da utilização dos mesmos contra fungos e bactérias (OJEDA-SENA et al., 2013).

Os OE atuam de duas maneiras como agentes antimicrobianos: de forma que controlam o crescimento bacteriano (bacteriostáticos) e quando adicionados em concentrações maiores, gerando morte celular (bactericida). O efeito bacteriostático é reversível, após a neutralização do agente bacteriano, o mesmo reestabelece a capacidade reprodutiva, já o efeito bactericida é permanente e gera alterações que impedem que o crescimento e reprodução bacterianos se reestabeleçam (FALEIRO, 2011).

Dentre os mecanismos pelos quais os OE atuam sob os microrganismos encontram-se a capacidade em realizar alterações de membrana, alterar a produção energética, alterar a síntese proteica, gerar distúrbios de pH, alterar o DNA e alterações intracitoplasmáticas que inviabilizam as células bacterianas através da saída de substâncias como o potássio para o meio extracelular (O'BRYAN et al., 2015; FALEIRO, 2011; CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

A ação antimicrobiana depende dos componentes químicos de cada óleo, sendo atribuída a substâncias como o linalol, um monoterpene oxigenado altamente hidrossolúvel presente no OE de manjerição, e capaz de penetrar a parede celular bacteriana, atuando como um solvente e desidratando os agentes microbianos (TELES-ANDRADE et al., 2014; STEFAN et al., 2013). Os OE oriundos do manjerição demonstraram um efeito antimicrobiano contra *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*, sendo a concentração inibitória mínima duas vezes menor que a concentração necessária para matar as bactérias (STEFAN et al., 2013).

A realização de testes de diluição para determinação da concentração inibitória mínima de cada OE se faz necessárias para estabelecer a efetividade dos mesmos contra os microrganismos, além disso, a determinação de uma concentração mínima com ação bactericida, capaz de matar 99,9% dos microrganismos, também deve ser estabelecida em cada situação. (CHOUHAN; SHARMA; GULERIA, 2017).

As bactérias gram-positivas são formadas externamente por uma parede celular composta principalmente por peptidoglicanos e moléculas proteicas de ácido teicoico, já bactérias gram-negativas apresentam uma membrana externa composta por LPS hidrofílicos, os quais impedem que os agentes hidrofóbicos dos OE possam penetrar, gerando uma maior resistência destes microrganismos aos compostos, ainda que, a longo prazo, os OE possam penetrar pelos canais de porinas que intercalam as estruturas de LPS (O'BRYAN et al., 2015).

Segundo Sikkema, Bont e Poolman (1994) hidrocarbonetos cíclicos são capazes de se acumular no interior da membrana celular, causando sua posterior ruptura, ou ainda, gerando alterações estruturais que ocasionem inibição e morte celular.

A associação de diferentes OE pode produzir diferentes efeitos, sejam eles aditivos, antagonistas e sinérgicos. O efeito aditivo é estabelecido quando a adição de dois ou mais OE produz a mesma resposta que apenas um dos OE. Já no sinergismo, o efeito produzido pela associação das substâncias torna-se maior do que quando utilizadas de forma individual e o antagonismo minimiza o efeito dos OE quando associados (FALEIRO, 2011).

A capacidade antimicrobiana dos OE está associada à presença principalmente de compostos fenólicos, entretanto, pode ser atribuída a outras substâncias capazes de interagir em menor quantidade potencializando seu efeito (GODINHO, 2012). Segundo Martins (2010), a inativação ou morte dos microrganismos é relacionada eugenol, carvacrol, linalol, terpineol, pipeno, citral, timol, entre outros.

2.3.3 Óleo essencial de manjeriço

O manjeriço (*Ocimum sp.*) apresenta cerca de 60 espécies, as quais diferenciam quimicamente a composição dos OE obtidos, entretanto, apresentam como principais componentes o linalol, eugenol e tau-cadinol. A espécie mais cultivada é o *Ocimum Basilicum*, a qual foi utilizada em nosso estudo (STEFAN et al., 2013). Em uma pesquisa realizada por Agostini e colaboradores (2009) o OE de manjeriço apresentou 36% de metil eugenol em sua composição.

Compostos como o álcool, aldeído, alcenos e éteres são encontrados no manjeriço, e assim, originam funções químicas sob a oxidação lipídica, toxicidade, e capazes de alterar a estrutura celular bacteriana (MARTINS, 2010).

O OE de manjeriço se demonstrou eficiente contra bactérias como *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Salmonella* spp. Entretanto, gerou pouca resposta frente à *Pseudomonas* spp. (NAZZARO et al., 2013). Conforme descrito por Tariq e colaboradores (2019) o OE de manjeriço ainda foi eficiente contra *Pseudomonas putida*, *Escherichia coli* e *Listeria innocua* e capaz de inibir o desenvolvimento de biofilme.

2.3.4 Óleo essencial de alecrim

O OE de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é rico em mirceno e alfa pineno, substâncias altamente antioxidantes e antimicrobianas, respectivamente (OJEDA-SENA et al., 2013). Em uma análise química realizada por Fu e colaboradores (2007), o OE de alecrim apresentou 27% de 1,8-cineol, 20% de alfa pineno e 15% de cânfora. Além disso, segundo Tariq e colaboradores (2019), o alecrim apresenta ainda linalol e canfeno.

Substâncias encontradas no OE de alecrim como o alfa pineno e o eucaliptol apresentaram atividade antimicrobiana, sendo o primeiro capaz de atuar tanto em bactérias gram-positivas quanto gram-negativas, e o segundo, na destruição da membrana celular de bactérias gram-negativas (OJEDA-SENA et al., 2013).

A utilização de OE de alecrim frente a bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris* exibiu susceptibilidade gerando um halo de inibição >10 mm, entretanto, frente à *Pseudomonas aeruginosa*, a resposta exibida foi inferior à 10 mm. Já quando utilizado em fungos como *Cândida albicans* e *Aspergillus* apresentou um halo de 21,5 ± 1,5 e 14 ± 0,7, respectivamente. A concentração inibitória mínima variou entre 0,125% a 1,000% e a concentração bactericida mínima dobrou em relação à CIM (FU et al., 2007).

O OE de alecrim ainda demonstrou efetividade contra patógenos como *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa*, sendo capaz de impedir o desenvolvimento de biofilme, e ainda, contra parasitas como *Strongylus vulgaris* (TARIQ et al., 2019).

2.3.5 Óleo Essencial de capim-limão

O OE de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) é um composto por compostos etanólicos como citral, compostos pelo dois isômeros neral e geraniol, e mirceno, sendo o primeiro componente, 60-80% do óleo e capaz de originar outras matérias primas utilizadas na indústria de alimentos (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993). Observou-se a efetividade de tal substância frente a bactérias dos gêneros *Pasteurella* e *Staphylococcus* sendo utilizado OE de capim-limão com 50-100% de citral, sendo a concentração inibitória mínima de 0,1% a 0,4% referente à *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente (CONTIERI, 2017; TARIQ, 2019).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AARESTRUP, F.M.; WEGENER, H.C.; COLLIGNON, P. Resistance of Bacteria of the Food Chain: Epidemiology and Control Strategies. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 6, p. 733-750, 2008.

ABOU EL-AMAIEM, W.; EL-DESOUKI, M.; ELDESOUKY, A.; MOTASER, A. Efficacy of different anti-bacterial medicaments for treatment of equine endometritis, **Veterinary Science & Technology**, v. 7, 2016.

AGOSTINI, F.; SANTOS, A. C. A.; ROSSATO, M.; PANSERA, M. R.; SANTOS, P. L.; SERAFINI, L. A.; MOLON, R.; MOYNA, P. Essential oil yield and composition of Lamiaceae species growing in southern Brazil. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 52, n. 2, p. 473-478, 2009.

AMÁBILE-CUEVAS, C.F. Antibiotic Resistance: From Darwin to Lederberg to Keynes. **Microbial Drug Resistance**, v.19, p. 73-87, 2012.

BELTAIRE, K. A.; CHEONG, S. H.; COUTINHO-SILVA, M. A. Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999-2011), **Equine Veterinary Journal**, v. 44, p. 84-87, 2012.

BENVINESTE, R.; DAVIS, J. Aminoglycoside Antibiotic-Inactivating Enzymes in Actinomycetes Similar to Those Present in Clinical Isolates of Antibiotic-Resistant Bacteria. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 70, p. 2276-2280, 1973.

BLACK, J. G. Microbiology: Principles and Explorations. 4th ed. New Jersey: Wiley, 1999.

BUCCA, S.; CARLI, A.; BUCKLEY, T.; DOLCI, G.; FOGARTY, U. The use of dexamethasone administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating induced endometritis. **Theriogenology**, v. 70, p.1093-1100, 2008.

CANISSO, I. F.; SEGABINAZZI, L. G. T. M.; FEDORKA, C. E. Persistent breeding-induced endometritis in mares – a multifaceted challenge: from clinical aspects to immunopathogenesis and pathobiology. **Internacional Journal of Molecular Science**, v. 21, p. 1-38, 2020.

CARD, C. Post-breeding inflammation and endometrial cytology in mares. **Theriogenology**, v. 64, p. 580-88, 2005.

CHOUHAN, S.; SHARMA, K.; GULERIA, S. Antimicrobial activity of some essential oils – present status and future perspectives. **Medicines**, v. 58, n. 4, p. 1-21, 2017.

COLBERN, G. T.; VOSS, J.L.; SQUIRES, E. L.; ELLIS, R. P.; SHIDELER, R. K.; MCCHENSEY, A. E. Development of a model to study endometritis in mares, **Theriogenology**, v. 7, p. 73-76, 1987.

CONTIERI, N. B. **Avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a isolados de Staphylococcus spp. E Pasteurella spp. oriundos da cavidade bucal de gatos domésticos**. 2017. 80 p. Dissertação (Mestrado em Ciências). Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, 2017.

COURVALIN, P. Predictable and unpredictable Evolution of antibiotic resistance. **Journal of International Medicine**, v. 264, p. 4-16, 2008.

COUTINHO-SILVA, M. A.; ALVARENGA, M. A. Fungal endometritis, cap. 273, p. 2643-2651. *In*: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, E. L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. 2 ed. New Delhi, Índia, John Wiley & Sons, 2011.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 224–228, 1993.

DASCANIO, J.J. Treatment of Fungal Endometritis, cap. 16, p. 116-120. *In*: SAMPER, J. C.; PYCOCK, J. F.; MCKINNON, A. O. **Current Therapy in Equine Reproduction**. 1 ed. St. Louis, Missouri, Souders, Elsevier, 2007.

DELL'AQUA JR., J. A.; PAPA, F. O.; LOPES, M. D.; ALVARENGA, M. A.; MACEDO, L. P.; MELO, C. M. Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination with equine frozen semen. **Animal Reproduction Science**, v. 94, p. 270-273, 2006.

FALEIRO, M. L. The mode of antibacterial action of essential oils. **Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances**, p. 1143-1156, 2011.

FAO. **Drivers, dynamics and epidemiology of antimicrobial resistance in animal production**, Rome, Italy, 58p, 2016.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais. **Química e sociedade**, v. 39, n. 2, p. 120-130, 2017.

FERRIS, R. A. Current understanding of bacterial biofilms and latente infections: a clinical perspective, **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v.41, p. 74-80, 2017.

FERRIS, R. A. Endometritis: diagnostic tools for infectious endometritis, **Veterinary Clinics Equine Practice**, v. 32, p. 481-498, 2016.

FERRIS, R. A.; MCCUE, P. M.; BORLEE, G. I.; LONCAR, K. D.; HENNET, M. L. BORLEE, B. R. In vitro efficacy of nonantibiotic treatments on biofilm disruption

- of gram-negative pathogens and in vivo model of infectious endometritis utilizing isolates from the equine uterus, **Journal of Clinical Microbiology**, v. 54, p. 631-639, 2016.
- FU, Q.; WEI, Z.; XIAO, P.; CHEN, Y.; LIU, X. CD44 enhances macrophage phagocytosis and plays a protective role in *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* infection, **Veterinary Microbiology**, v. 198, p. 121-126, 2017.
- FU, Y.; ZU, Y.; CHEN, L.; SHI, X.; WANG, Z.; SUN, S.; EFFERTH, T. Antimicrobial activity of clove and rosemary essential oils alone and in combination. **Phytotherapy research**, v. 21, p. 989-994, 2007.
- FURUYA, E.Y.; LOWY, F.D. **Antimicrobial-resistant bacteria in the Community setting**. Nature Publishing Group, 2006. 4: 36-45.
- GODINHO, G. C. **Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço**. 2012. 79 p. Dissertação (Trabalho de conclusão de curso). Fundação Educacional do Município de Assis, 2012.
- GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L. DA S.; PUPO, M.T. Antibióticos: importância terapêutica e perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p. 667-679, 2010.
- IBRAHIM, S.; SZÓSTEK-MIODUCHOWSKA, A.; SKARZYNSKI, D. Expression profiling of selected miRNAs in equine endometrium in response to LPS challenge in vitro: A new understanding of the inflammatory immune response, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 209, p. 37-44, 2019.
- KATILA, T. Onset and duration of uterine inflammatory response of mares after insemination with fresh semen, **Biology Reproduction**, v. 52, p. 515-517, 1996.
- LEBLANC, M. M. The current status of antibiotic use in equine reproduction, **Equine Veterinary Education**, v. 21, p. 156-167, 2009.
- LEBLANC, M.M.; CAUSEY, R. C. Clinical and subclinical endometritis in the mare: both threats to fertility, **Reproduction of Domestic Animals**, v. 44, p. 10-22, 2009.
- LEBLANC, M. M.; MAGSIG, J.; STROMBERG, A. J. Use of a low-volume uterine flush for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**, v. 68, p. 403-412, 2007.
- LEHRER, R. I.; GANZ, T.; SELSTED, M. E.; BABIOR, B. M.; CURNUTTE, J. T. Neutrophils and host defense, **Annals of Internal Medicine**, v. 109, p. 127-142, 1988.
- LEVY, B.S.; MARSHALL, B. Antibacterial Resistance Worldwide: causes, challenges and responses. **Nature Medicine Supplement**, v. 10, 2004.

LONCAR, K. D.; FERRIS, R. A.; MCCUE, P. M.; BORLEE, G. I.; HENNET, M. L.; BORLEE, B. R. In vitro biofilm disruption and bacterial killing using nonantibiotic compounds against gram-negative equine uterine pathogens, **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 53, 2017.

MAHAL, J. S.; HONPARKHE, M.; KUMAR, A.; SINGH, P. Efficacy of intrauterine hydrogen peroxide and povidone iodine administration to treat endometritic mares, **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 9, p. 2427-2431, 2020.

MALSCHITZKY, E.; SCHILELA, A.; MATTOS, A. L. G.; GARBADE, P.; GREGORY, R. M.; MATTOS, R. C. Intrauterine fluid accumulation during foal heat interchanges embryonic death. **Pferdeheilkunde**, v.19, n. 6, 2003.

MARTÍNEZ, J.L.; BAQUERO, F. Antibiotics and the Evolution of Antibiotic Resistance. **Environmental Microbiology Reports**, v.1, n. 6, p. 469–476, 2009.

MARTINS, A. G. L. A. **Atividade antibacteriana dos óleos essenciais do manjeriço (*Ocimum basilicum* Linnaeus) e do gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) frente a linhagens de *Escherichia coli* enteropatogênicas isoladas de hortaliças**. 2010. 179p. Dissertação (Doutorado). Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de anacardiaceae, siparunaceae e verbenaceae**. 2010. 173 p. Dissertação (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Viçosa. Viçosa, 2010.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria, **Pharmaceuticals**, v. 6, p. 1451-1474, 2013.

NÉVOA, M.L.; JR. CARAMORI, J.G.; VIETES, F.M.; NUNES, R.V.; JUNIOR, J.G. de V.; KAMIMURA, R. Antimicrobianos e pebióticos nas dietas de animais não ruminantes. **Scientia Agraria Paranaensis**, v.12, p. 85-95, 2013.

NIELSEN, J. M. Endometritis in the mare: a diagnostic study comparing cultures from swab and biopsy. **Theriogenology**, v. 64, p. 510-518, 2005.

O'BRYAN, C. A.; PENDLETON, S. J.; CRANDALL, P. G.; RICKE, S. C. Potential of plant essential oils and their components in animal agriculture – in vitro studies on antibacterial mode of action. **Frontiers in Veterinary Science**, v. 2, art. 35, 2015.

OJEDA-SENA, A. M.; VAN-BAREN, C. M.; ELECHOSA, M. A.; JUÁREZ, M. A.; MORENO, S. New insights into antibacterial and antioxidante activities of

rosemary essential oils and their main components. **Food Control**, v. 31, p. 189-195, 2013.

PEREIRA, R. J.; NASCIMENTO, G. N. L. **Compostos Bioativos Vegetais**. Universidade Federal do Tocantins, 142 p. 2014.

POTTZ, G. E.; RAMPEY, J. H.; BENJAMIN, F. The effect of dimethyl sulfoxide (DMSO) on antibiotic sensitivity of a group of medically important microorganisms: preliminary report, **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1, p. 261-272, 1967.

PRESCOTT, F. John. Quimioterapia Antimicrobiana. *In*: McVEY, D. Scott; Kennedy, Melissa; Chengappa, M.M. **Microbiologia Veterinária**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 26-44, 2016.

PREZIUSO, S.; MORICONI, M.; CUTERI, V. Genetic diversity of *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* isolated from horses, **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 65, 2019.

PYCOCK, J. F. How to maximize the chances of breeding successfully from the older maiden mare. **AAEP Proceedings**, v. 52, 2006.

REDDY, D. N. Essential oils extracted from medicinal plants and their applications, cap. 9, p. 237 – 283. *In*: AKHTAR, M. S.; SWAMY, M. K.; SINNIHAH, U. R. **Natural Bio-active Compounds: production and applications**, v.1, Springer Nature Singapore, 2019.

RODRIGUEZ, J. S.; HAN, S.; NIELSEN, S.; PEARSON, L. K.; GAY, J. M.; TIBARY, A. Consequences of intrauterine enrofloxacin infusion on mare endometrium, **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 32, p. 106-111, 2012.

SANTOS, D. Y. A. C. **Botânica Aplicada: metabólitos secundários na interação planta-ambiente**. 2015. 124 p. Dissertação (Livre-docência junto ao departamento de botânica) – Universidade de São Paulo, Instituto de Biociência. São Paulo, 2015.

SCHNOBRICH, M. R.; PEARSON, L. K.; BARBER, B. K.; BRADECAMP, E.; TIBARY, A. Effects of intrauterine infusion of a water-based suspension of enrofloxacin on mare endometrium, **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 35, p. 662-667, 2015.

SCOTT, C. J. A review of fungal endometritis in the mare, **Equine Veterinary Education**, 2018.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.18, n. 11, 1994.

STEFAN, M.; ZAMBIRACHE, M. M.; PADURARIU, C.; TRUTA, E.; GOSTIN, I. The composition and antibacterial activity of essential oils in three *Ocimum* species growing in Romania. **Central European Journal of Biology**, v. 8, n. 6, p. 600-608, 2013.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIHAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 21 p., 2016.

TARIQ, S.; WANI, S.; RASOOL, W.; SHAFI, K.; BHAT, M. A.; PRABHAKAR, A.; SHALLA, A. H.; RATHER, M. A. A comprehensive review of the antibacterial, antifungal and antiviral potential of essential oils and their chemical constituents against drug-resistant microbial pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 134, 2019.

TAVARES, W. **Manual de Antibióticos e Quimioterápicos Anti-infecciosos**. 2. Ed. São Paulo: Atheneu, 792p, 2001.

TELES-ANDRADE, B. F. M.; BARBOSA, L.N.; PROBST, I. S.; FERNANDES-JUNIOR, A. Antimicrobial activity of essential oils. **Journal of Essential Oil Research**, v. 26, n. 1, p. 34-40, 2014.

TEUBER, M. **Veterinary use and antibiotic resistance**. Current Opinion in Microbiology, v. 4, p. 493-499, 2001.

TROEDSSON, M. H. T. Endometritis, cap.271, p. 2608-2619. *In*: MCKINNON, A. O.; SQUIRES, L.; VAALA, W. E.; VARNER, D. D. **Equine Reproduction**. 2 ed. New Delhi, Índia, John Wiley & Sons, 2011.

TRUNDELL, D. A.; FERRIS, R. A.; HENNET, M. R.; WITTENBURG, L. A.; GUSTAFSON, D. L.; BORLEE, B. R.; MCCUE, P. M. Pharmacokinetics of intrauterine ciprofloxacin in the mare and establishment of minimum inhibitory concentrations (MIC) for equine uterine bacterial isolates, **Journal of Equine Veterinary Science**, 2017.

WALTER, J.; NEUBERG, K. P.; FAILING, K.; WEHREND, A. Cytological diagnosis of the endometritis in the mare: investigations of sampling techniques and relation to bacteriological results. **Animal Reproduction Science**, v. 132, p. 178-186, 2012.

WITTENBRINK, M. M.; HOLZLE, L.; BAUMEISTER, A. K. Mechanisms of bacterial pathogenesis in equine endometritis, **Pferdeheilkunde**, v. 13, p. 450-452, 1997.

HIPÓTESE

Os óleos essenciais de Manjeriçã, Alecrim e Capim Limão apresentam capacidade bacteriostática e bactericida sobre os principais microrganismos causadores de endometrite em éguas: *Streptococcus equi zooepidemicus*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Escherichia coli* e *Candida albicans*.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima dos óleos essenciais;
- Determinar a Concentração Bactericida Mínima dos óleos essenciais;
- Comparar a sensibilidade microbiana entre antibióticos e óleos essenciais;
- Determinar qual o óleo essencial com maior potencial inibitório;
- Determinar as melhores concentrações de óleo essencial para o controle bacteriano;
- Determinar qual o microrganismo com maior sensibilidade aos óleos essenciais;

CAPÍTULO 2

1 Artigo redigido segundo as normas da Theriogenology, ISSN 0093-691X, ranqueada
2 como A2 pelo QUALIS – Triênio 2013-2016.

3 <https://www.elsevier.com/journals/theriogenology/0093-691x/guide-for-authors>

4

5 **IN VITRO ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS FROM *Ocimum***

6 ***basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, AND *Cymbopogon citratus* AGAINST**

7 **ENDOMETRITIS-CAUSING MICROORGANISMS IN MARES**

8 Lisboa, F. P.^{ab,*}; Martins, G. V.^c; Silvestre, W. P.^b; Castro, J. O.^b; Dell'Aqua Jr., J. A.^a

9 ^a – Department of Veterinary Surgery and Animal Reproduction, School of Veterinary
10 Medicine and Animal Science, São Paulo State University – UNESP, Botucatu, Brazil;

11 ^b – Postgraduate Program in Biotechnology, Universidade de Caxias do Sul, Caxias do
12 Sul, Brazil;

13 ^c – Freelancer veterinarian, Caxias do Sul, Brazil.

14 * – Corresponding author. E-mail: pxlisboa@gmail.com

15 Abstract: This study aimed to evaluate the antimicrobial activity of the essential oils from
16 *Ocimum basilicum* (basil), *Rosmarinus officinalis* (rosemary), and *Cymbopogon citratus*
17 (lemongrass) on endometritis-causing microorganisms in mares. Serial concentrations
18 of the essential oils from 30.00 mg/mL⁻¹ (3.00% v/v) to 0.47 mg/mL⁻¹ (0.05% v/v) were
19 tested. The major compounds of *O. basilicum* oil were linalyl acetate (33.32 wt.%) and
20 citronellal (25.06 wt.%); of *R. officinalis* were borneol (26.48 wt.%), *trans*- β -ocimene
21 (16.76 wt.%), camphene (12.45 wt.%), and α -phellandrene (11.08 wt.%); and of *C.*
22 *citratus* were geranial (45.96 wt.%) and neral (32.62 wt.%). Regarding the antimicrobial
23 activity, *C. citratus* essential oil has had the highest inhibition percentage (73.9%),
24 followed by *O. basilicum* (67.2%), and *R. officinalis* (58.7%). The species *Pseudomonas*
25 *aeruginosa* was the only pathogen which was not possible to establish the MIC and MBC
26 values for the studied oils in tested concentrations; the other pathogens were controlled
27 by the essential oils. Due to the low probability in the formation of bacterial resistance
28 against essential oil compounds, these products have potential to be used in empiric

29 therapy and in long-term treatments. However, even with promising antimicrobial
30 potential of these oils, more studies are necessary to elucidate the mechanism of action
31 of these molecules, as well as to render them feasible to be used *in vivo*.

32 Keywords: endometritis, bacterial resistance, phytopharmaceuticals, terpenes.

33 1. Introduction

34 Endometritis is considered the main cause of infertility in mares, being responsible
35 of significant economic losses in the equestrian industry [1]. This condition is caused by
36 the inability of the uterine defenses in eliminating inflammatory and microbial products
37 and can be classified as acute or chronic, clinical or subclinical, and infectious or non-
38 infectious. [2,3]. This inability may arise due to several factors, which may be related or
39 not, such as anatomic genital malformations, reduced myometrial contractions,
40 insufficient lymphatic drainage and mucociliary cleaning, lesions of cervix, and vascular
41 degenerations [2].

42 Among the endometritis causes, the infectious ones are the most frequent [4].
43 However, in the clinical practice, they may occur concomitantly to non-infectious causes
44 [5]. The infectious endometritis are mainly caused by bacteria, but may also be caused
45 by opportunistic fungi [3]. The concomitant growth of fungi and bacteria is not rare, being
46 necessary to associate antifungal and antibacterial courses of treatment in these cases
47 [6].

48 Mares have three main mechanisms that are responsible to defend the uterus
49 against the development of bacterial endometritis: physical barriers of the upper
50 reproductive tract, innate immunity and uterine contractility [2]. However, when the
51 organism fails to establish one of these mechanisms, it develops the pathology.

52 These microorganisms, opportunistic or pathogenic, may access the uterus by
53 natural intercourse, artificial insemination or during the application of reproductive
54 techniques, such as embryo transfer. However, healthy females, classified as resistant,

55 are capable to respond quickly to the aggression, eliminating it in approximately 48 h [7].
56 On the other hand, mares that have some of the predisposing factors already cited, fail
57 to remove the microorganisms, remaining contaminated, being classified as susceptible
58 [8].

59 The chronic cases of endometritis are especially worrisome, since the affected
60 mares present themselves as refractory to previous treatments. A possible explanation
61 for this condition may be the development of a biofilm by the bacteria, development of
62 antimicrobial resistance to the treatment, or even reinfection cases by the same
63 pathogen [6]. In these cases, it is common the use of antimicrobials in several cycles,
64 increasing the risks of the pathogens develop antibiotic resistance or fungal endometritis.

65 The main course of treatment of bacterial endometritis consists in the parenteral
66 or intrauterine application of antibiotics. The selection of the antibiotic agent to be used
67 must be based in the microorganism culture and susceptibility tests, although some *in*
68 *vitro* responses may be different relative to the clinical application [9]. However, it is still
69 common the indiscriminate use of antibiotics as a routine, which are used without a
70 proper evaluation of microbial susceptibility, fostering further the development of
71 antibiotic resistance.

72 In this regard, several studies are being carried out to develop new therapies, such
73 as Platelet Rich Plasma (PRP) [10], ozone [11], stem cells [12], immunomodulators
74 [13,14], lactoferrin [15], application of bacterial extracts [16], and phytopharmaceuticals
75 [17]. The use of plants and their derivatives, such as the essential oils (EO) occurs since
76 ancient times, being important in both the human and veterinarian medicine, especially
77 in traditional medicine [18]. The essential oils are extracted from several plant parts,
78 depending on the species [19].

79 Essential oils are mixtures composed mainly by volatile terpenes with low
80 molecular mass, which are used in fragrances, cosmetics, pharmaceuticals, and
81 chemical industry [19,20]. Literature has reports on their antiseptic, antibacterial,

82 antiviral, antioxidant, antiparasitic, antifungal, and insecticidal properties, beyond being
83 a tool to reduce the occurrence of bacterial resistance to synthetic antibiotics [21–23].

84 With the demand for efficient alternatives to bacterial infections treatments, there
85 is a constant flow of studies related to the use of EO's due to their antimicrobial activity
86 [18]. It is difficult to attribute the antimicrobial action of an EO to only one of its
87 components, since EO are complex mixtures of several substances, and the roles of
88 synergistic and antagonistic effects must also be accounted for the overall antimicrobial
89 activity of the EO [24].

90 EO's act in two ways as antimicrobial agents: hindering the bacterial growth
91 (bacteriostatics) and, when applied in larger concentrations, causing cell death
92 (bactericidal). Moreover, there are no reports in the literature on the development of
93 microbial resistance to essential oils and terpenes.

94 There are several OE with proven antimicrobial action, but the availability and
95 composition of plants for extraction can vary between regions as well as the possibility
96 of finding them in commercial presentation. The use of basil, rosemary and lemongrass
97 OE is quite common in the food industry, making it easy to buy in the market. In addition,
98 using commercial products the variation between compounds can be mitigated, since all
99 plants are harvested in the same area and at the same time of the year, thus reducing
100 discrepancies between OE matches.

101 Thus, the objective of this work was to evaluate the *in vitro* antimicrobial effect of
102 the EO of *Ocimum basilicum* (basil), *Rosmarinus officinalis* (rosemary), and
103 *Cymbopogon citratus* (lemongrass) on the main species of endometritis-causing
104 pathogens in mares.

105 2. Materials and methods

106 2.1. Isolation, selection, and storage of the pathogens

107 The microorganisms used in this study were collected from mares with suspected
108 endometritis that belonged to commercial reproductive programs during the 2017/2018
109 breeding season. The age of the animals ranged between 3 and 24 years, being all of
110 Crioulo breed, from farms of the region of Caxias do Sul, South Brazil, kept under
111 different managements, used for breeding, embryo donors or recipients mares, which
112 have presented clinical signs of accumulation of uterine liquid, shortening of estrous
113 cycle, exacerbated edema, cloudy uterine lavages and/or a history of infertility for at least
114 two estrous cycles using good quality semen from stallions with recognized fertility.

115 After the first trial, the following pathogens were selected: *Streptococcus equi*
116 *zooepidemicus*; *Staphylococcus aureus*; *Klebsiella pneumoniae*; *Pseudomonas*
117 *aeruginosa*; *Escherichia coli*; and *Candida Albicans*. The selection was based on the
118 main agents that were isolated in the cases of equine endometritis (5-6, 25). To confirm
119 the condition of endometritis, besides the ultrasonographic evaluation and the
120 reproductive history, uterine cytology and microbiology evaluations were also carried out.

121 The microbiologic evaluation was carried out using an equine uterine swab
122 (Provar[®]). After the collection, the sample was identified and put in a transport tube with
123 Stuart medium (Absorve[®]) and sent for analysis in less than 12 h. For the microbial
124 isolation, the samples were replicated in blood-agar and MacConkey agar media, both
125 under aerobic conditions at 37±0.5 °C for 24 h. The same samples were replicated in
126 yeast extract peptone dextrose (YEPD) medium with ampicillin (100µg/mL) to verify the
127 growth of fungi, being kept at 28±0.5 °C for 72 h.

128 After the incubation period, the samples that presented microbial growth were kept
129 at -80 °C until use in the subsequent experiments. For freezing, the samples were put to
130 grow for 12 h until reaching the exponential phase; glycerol was added to the medium
131 up to the final concentration of 30% v/v [26].

132 The cytologic evaluation was carried out immediately after sample collection with
133 the uterine cytobrush. The microscopy slides and coloration using Diff-Quik were
134 performed in the field, being evaluated after in the laboratory. Slide reading was carried

135 out following the procedures described by Riddle et al. (2007) [4]; the investigation of
136 fungal endometritis was carried out concomitantly, since the presence of hyphae and
137 yeasts was also investigated. This evaluation was the basis to choose the pathogenic
138 species studied in this work since were selected only the microorganisms from mares
139 that have had a confirmed diagnosis of endometritis.

140 2.2. Identification of the pathogenic agents by MALDI-TOF

141 The identification of the species or genera was carried out using the Biotyper 3.1
142 software (Bruker, USA), coupled to the DTUVet MSP database. The mass spectra were
143 obtained using a Antoflex Speed instrument (Bruker Daltonics, USA), calibrated with the
144 *Escherichia coli* DH5 α standard (BTS). The samples were extracted following the
145 procedures described by Bizzini et al. (27). One microliter (1.0 μ L) of the bacterial extract
146 was put on the MALDI target-plate, dried at 20-22 °C, and covered with alpha-cyano-4-
147 hydroxycinnamic acid (HCCA) matrix prior to acquisition.

148 2.3. Antibigram

149 The susceptibility testes were carried out following the disk diffusion method in the
150 Muellen-Hinton medium, in accordance with the procedures of the Clinical and
151 Laboratory Standard Institute [28]. After isolation, the samples were inoculated in sterile
152 saline solution until obtaining a turbidity of 0.5 in the McFarland scale. Using a sterile
153 swab, the material was dispersed throughout the entire plate. Finally, the antibiotic disks
154 were distributed with a sufficient distance to allow for reading. The antibiotics used in the
155 test and their doses are presented in Table 1.

156

157

158

159

160 Table 1 – Antibiotics used in the disk diffusion sensibility test using the Mueller-Hinton agar
 161 medium.

Antibiotic	Dose	Abbreviation
Amikacin	30 µg	AMI
Ampicillin	10 µg	AMP
Cefepime	30 µg	CPM
Ceftriaxone	30 µg	CRO
Ceftiofur	30 µg	CTF
Gentamicin	10 µg	GEN
Penicillin G	10 UI	PEN
Oxacillin	1 µg	OXA
Doxycycline	30 µg	DOX
Rifampicin B	30 µg	RFM
Co-trimoxazole ¹	25 µg	SUT
Enrofloxacin	5 µg	ENO

162 1 – trimethoprim and sulfamethoxazole (1:5 proportion).

163 After incubation for 24 h at 37±0.5 °C, the readings were performed. The diameter
 164 of the inhibition halo was evaluated, and classified as resistant or susceptible [28].

165 2.4. Essential oil extraction and preparation of emulsions

166 The essential oils of *O. basilicum*, *R. officinalis*, and *C. citratus* used in the present
 167 study were bought from a local company (Tekton, Viamão, Brazil), and were extracted
 168 by steam distillation. The essential oil concentrations and the emulsifier used were
 169 defined in a pilot run, avoiding any interferences in the microbial growth. The tested
 170 concentrations ranged between 0.05 and 3.00% v/v, being 0.47, 0.94, 1.88, 3.75, 7.50,
 171 15.00, and 30.00 mg·mL⁻¹. Tween-80[®] was chosen as the emulsifier, whose
 172 concentration was 1.00% v/v (10.00 mg/mL⁻¹).

173 Firstly, the essential oils were emulsified in a stock solution to be incorporated to
 174 the medium used in the tests. The stock solution was prepared with the following
 175 concentrations: 60% v/v of sterile distilled water, 10% v/v of Tween-80[®], and 30% v/v of
 176 EO. The solution was homogenized and kept in an ultrasonic bath for 30 min to maintain
 177 the solution stability during the tests.

178 2.5. Evaluation of the essential oil's chemical composition

179 The qualitative analysis of the essential oils was carried out by GC/MS; the
 180 qualitative analysis was performed by GC-FID. The GC-FID analysis was carried out

181 using a Hewlett Packard 6890 Series gas chromatograph, equipped with an HP-
182 Chemstation data processing unit, and an HP-Innowax column (30 m x 320 μm i.d.) with
183 0.50 μm film thickness (Hewlett Packard, Palo Alto, USA). Temperature programming
184 was 40 $^{\circ}\text{C}$ for 8 min, from 40 $^{\circ}\text{C}$ to 180 $^{\circ}\text{C}$ at 3 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$, from 180 to 230 $^{\circ}\text{C}$ at 20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$,
185 230 $^{\circ}\text{C}$ for 10 min; injector temperature of 250 $^{\circ}\text{C}$; split ratio 1:50, FID detector at 250
186 $^{\circ}\text{C}$; hydrogen as carrier gas at 34 kPa, injected volume of 1 μL , diluted in hexane (1:10).
187 The GC/MS analysis was carried out using a gas chromatograph, coupled with an HP
188 6890/MSD5973 mass spectrometer, equipped with an HP-Chemstation and the Wiley
189 275 spectra library. A HP-Innowax fused silica capillary column (30 m x 320 μm i.d.) with
190 0.50 μm film thickness was used. The temperature program used was the same as GC-
191 FID; interface at 280 $^{\circ}\text{C}$; split ratio 1:100; helium as carrier gas at 56 kPa; flow rate of
192 1.0 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$; ionization energy of 70 eV; injected volume of 1 μL diluted in hexane (1:10).

193 The constituents of the essential oils were identified by comparison of their mass
194 spectra with the ones of the Wiley spectral library (GC/MS) and by comparison of the
195 linear retention index (LRI) from literature data [29]. The LRI values were calculated with
196 the Van den Dool and Kratz equation, using the retention times of a C8-C30 alkane
197 standard, under the same chromatographic conditions.

198 2.6. Determination of the MIC and MBC values

199 The determination of the minimum inhibitory concentrations (MIC) was carried out
200 using the medium microdilution technique, following the protocols described by the
201 Clinical and Laboratory Standard Institute [28].

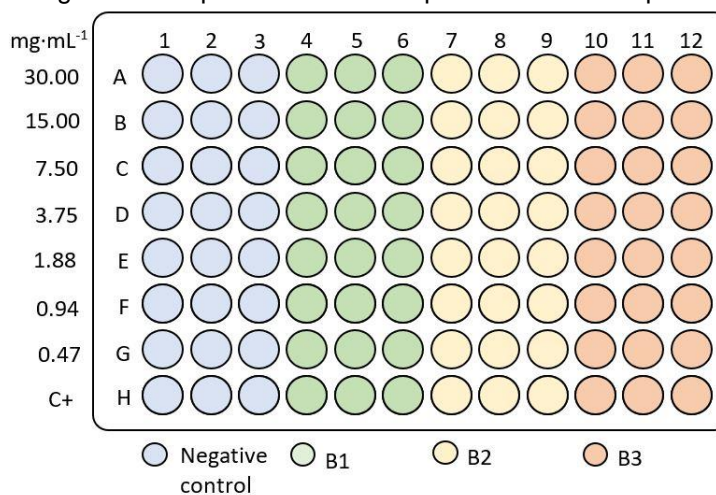
202 The cultures were activated by seeding in the blood-agar medium and incubated
203 at 37 ± 0.5 $^{\circ}\text{C}$ for 24 h. The bacterial/fungal suspensions were prepared using test tubes
204 with sterile saline solution standardized at 0.5 in the McFarland scale (BioMérieux,
205 França). After, 100 μL of the inoculum were diluted in 900 μL of Muellen-Hinton agar
206 medium, with a final suspension with $1.5\cdot 10^7$ UFC $\cdot\text{mL}^{-1}$.

207 The serial microdilution teste was carried out using 96-well flat bottom microplates.
 208 All wells were filled with 100 μL of Muellen-Hinton agar medium. After, more 80 μL of the
 209 medium and 20 μL of the stock solution were added to the first line, rendering a final EO
 210 concentration of 3% v/v ($\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$). Using a multichannel micropipette, a serial dilution
 211 was carried out up to the penultimate line of the plate, being discarded the last remaining
 212 100 μL . The last row was used as a positive control, in which only the Muellen-Hinton
 213 agar medium and the pathogen were added.

214 The first three columns of each plate were used as negative controls, being added
 215 only the EO emulsion and the Muellen-Hinton agar medium, being used as the standard
 216 control for the spectrophotometric readings. Finally, 5 μL of the bacterial/fungal
 217 suspension were added to all wells from the fourth column onwards, obtaining a final
 218 concentration of $5.0\cdot 10^4 \text{UFC}\cdot\text{mL}^{-1}$. In each plate were tested three bacteria and only one
 219 EO, all in triplicates. A scheme of the treatments for each plate is presented in Figure 1.

220

Figure 1 – Disposition of the samples in the 96-well plate.



221

222 B1: bacteria 01; B2: bacteria 02; B3: bacteria 03; C+: positive control; each row is represented by
 223 the final concentration of essential oil.

224 The microplates were packed with plastic film to avoid dehydration and
 225 interference on other plates that could be caused by a possible EO volatilization. The
 226 plates were kept at 37 ± 0.5 °C for 24 h. After the incubation period, the visual readings
 227 were carried out and the optical density of the wells at 600 nm was evaluated using a

228 SpectraMax M2 spectrophotometer (Molecular Devices, USA). The inhibition percentage
229 was calculated with

230 To calculate the inhibition percentage, firstly the difference between the
231 absorbance average of the triplicate containing the pathogen and the average of the
232 negative control triplicate was calculated, both in the same concentration (same line).
233 Afterwards, the densitometric difference between the mean of the triplicate of the treated
234 groups and the mean of the triplicate of the positive control for each bacterium was
235 evaluated. The results were presented as a percentage.

236 To determine the real MIC values, 10 μ L of a resazurin solution (0.01% v/v) were
237 added to each well; the plates were incubated for 1 h at 37 ± 0.5 °C. Resazurin is a blue
238 dye that is also a redox indicator; viable cells react with the dye, reducing it to a product
239 which has pink color [30]. According with the result reaction, the dilutions that have not
240 changed color were sown in blood-agar medium and incubated for 24 h at 37 ± 0.5 °C to
241 observe the MBC values. In the cases that there was microbial growth without color
242 change, higher concentrations were sown until no growth was observed, determining the
243 MBC values.

244 2.7. Experimental design and statistical analysis

245 The experimental design was bifactorial; the considered factors were the
246 pathogenic species, and the EO concentrations, with three replicates for each treatment.
247 The EO kind was considered a fixed factor and not evaluated in the statistical analysis.
248 This corresponded to a 6x8 design in three repetitions for each EO tested.

249 The data on percentual inhibition underwent analysis of variance (ANOVA), and
250 the means were compared by Tukey's multiple range test at 5% probability ($\alpha = 0.05$). It
251 was used the AgroEstat software (Brazil) to carry out the statistical analysis.

252 3. Results and discussion

253 3.1. Essential oil chemical characterization

254 The EO's used on this research were chosen based in the literature reports and
 255 also in previous studies carried out [17,31–33] in the same topic. The results of the
 256 chromatographic analyses are presented in Table 2.

257

258 Table 2 – Chemical composition of the essential oils of *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus*
 259 *officinalis*, and *Cymbopogon citratus*.

Compound	Calc. LRI	Lit. LRI ¹	wt. %		
			<i>O. basilicum</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>C. citratus</i>
santolina triene	906	906	-	-	0.11
α -thujene	928	924	-	0.41	0.12
α -pinene	935	932	0.07	-	0.06
camphene	941	946	-	12.45	-
benzaldehyde	951	952	0.16	-	-
2,4-tujadiene	954	953	-	4.19	-
sabinene	967	969	-	-	0.06
β -pinene	980	979	1.20	4.26	0.04
myrcene	991	988	1.05	-	1.89
<i>trans</i> -linalool oxide	993	991	-	-	2.69
α -phellandrene	999	1002	-	11.08	-
3-carene	1009	1008	-	0.26	-
p-cymene	1021	1020	-	0.61	-
<i>cis</i> - β -ocimeno	1036	1032	0.61	-	3.17
santolina alcohol	1037	1034	-	-	0.13
<i>trans</i> - β -ocimeno	1042	1044	-	16.76	0.09
γ -terpinene	1049	1054	-	0.04	0.06
3,8-p-menthadiene	1070	1068	-	0.49	0.18
linalool	1092	1095	1.07	1.13	0.17
<i>cis</i> -thujone	1102	1101	-	0.35	1.54
6-camphenol	1111	1111	-	1.79	-
<i>trans</i> -thujone	1108	1112	0.06	-	0.13
<i>cis</i> -limonene oxide	1130	1132	-	0.97	-
camphor	1142	1141	0.17	-	0.17
citronellal	1151	1148	25.06	-	0.47
borneol	1162	1165	-	26.48	0.26
<i>cis</i> -linalool oxide	1169	1170	0.31	-	-
terpinen-4-ol	1175	1174	-	2.06	-
<i>cis</i> -pinocarveol	1184	1182	0.26	1.37	0.25
estragole	1194	1195	1.90	-	-
γ -terpineol	1199	1199	-	-	0.48
verbenone	1206	1204	-	2.19	-
citronellol	1221	1223	-	4.23	-
nerol	1227	1227	-	0.08	-
neral	1236	1235	-	-	32.62
geraniol	1245	1249	-	0.33	-

linalyl acetate	1255	1254	33.32	0.32	-
geranial	1264	1264	-	-	45.96
citronellyl formate	1271	1271	-	-	1.07
thymol	1289	1289	11.67	0.90	-
carvacrol	1303	1298	-	0.07	-
terpinyl acetate	1301	1300	-	-	0.72
citronellic acid	1308	1312	-	-	0.34
linalool propionate	1328	1334	-	-	0.12
citronellyl acetate	1345	1350	-	-	1.23
eugenol	1353	1356	-	0.07	-
neryl acetate	1363	1359	0.44	0.07	-
carvacrol acetate	1370	1370	-	-	0.69
α -copaene	1375	1374	-	0.05	-
geranyl acetate	1380	1379	0.71	0.18	2.73
β -cubebene	1389	1387	0.12	-	-
methyl eugenol	1396	1403	2.69	-	-
(Z)- β -cariofileno	1409	1408	-	1.05	0.13
β -copaene	1424	1430	0.16	3.55	-
<i>trans</i> - α -bergamotene	1433	1432	-	-	0.23
γ -elemene	1434	1434	-	0.06	-
α -guaiene	1439	1437	0.08	-	-
<i>cis</i> - β -farnesene	1440	1440	-	-	0.10
citronellyl propionate	1444	1444	-	0.07	-
α -caryophyllene	1458	1452	0.20	-	-
α -humulene	1455	1452	-	0.63	-
ethyl cinnamate	1467	1465	0.16	-	-
γ -muurolene	1481	1478	-	0.30	-
germacrene-D	1486	1484	0.19	-	-
β -selinene	1488	1489	-	-	0.06
α -selinene	1499	1498	-	0.13	0.33
α -bisabolene	1504	1506	-	0.09	0.09
germacrene-A	1510	1508	5.47	-	-
γ -cadinene	1512	1513	0.28	0.26	-
δ -cadinene	1519	1522	0.21	0.14	-
(Z)-nerolidol	1528	1531	-	-	0.53
α -cadinene	1537	1537	-	0.22	0.03
11- α -copaenol	1542	1539	-	0.05	-
caryophyllene oxide	1582	1582	1.23	0.13	-
allo-cedrol	1588	1589	1.37	-	-
α -bisabolol	1687	1685	-	0.06	-
Monoterpenes			2.93	50.55	5.78
Oxygenated monoterpenes			77.82	42.59	91.77
Sesquiterpenes			6.71	6.26	0.94
Oxygenated sesquiterpenes			2.60	0.24	0.53
Not identified			9.94	0.36	1.29

261 The major compounds found in the *O. basilicum* EO were linalyl acetate (33.02
262 wt.%) and citronellal (25.06 wt.%). In the *R. officinalis* EO, borneol was the major
263 compound (26.48 wt.%), followed by *trans*- β -ocimene (16.76 wt.%), camphene (12.45
264 wt.%), and α -phellandrene (11.08 wt.%). The OE of *C. citratus* has had geranial (45.96
265 wt.%) and neral (32.62 wt.%) as the major compounds, corresponding to 78.58 wt.% of
266 the total EO composition.

267 The results of the chromatographic analysis of the EO's used in the present study
268 indicated that the *O. basilicum* EO presented a linalyl acetate/citronellal chemotype.
269 Ojeda-Sana et al. [24] reported pineno-cineole and myrcene-cineole-camphor
270 chemotypes for *O. basilicum* EO from different populations. Muráriková et al. [34],
271 reported several chemotypes for this species, ranging from methyl-eugenol, estragole,
272 linalool, and 1,8-cineole; the authors also commented on the wide variability relative to
273 the chemotypes observed in this species.

274 The *R. officinalis* EO had borneol/*trans*- β -ocimene/ α -phellandrene chemotype.
275 Silvestre et al. [35] and Atti-Santos et al. [36] reported a pineno-cineole chemotype for
276 *R. officinalis* EO obtained in South Brazil (α -pinene contents of 37.26-41.63 wt.% and
277 1,8-cineole contents of 19.35-26.24 wt.%), with borneol contents in the range of 2.75-
278 3.10 wt.%. However, Jamshidi et al. [37] reported for *R. officinalis* EO from France large
279 amounts of bornyl acetate (14.30 wt.%), a derivative of borneol.

280 The EO from *C. citratus* was mainly composed by citral (neral and geranial
281 isomers). The citral chemotype is the most common chemotype for this species, as
282 reported by Tajidin et al. [38] and Costa et al. [39], with citral contents higher than 70
283 wt.%.

284 Several factors influence directly the chemical composition of EO, such as
285 genetics, edaphoclimatic conditions, stage of development of the plant, epoch and time
286 of collection of the plant material, among others [40]. Thus, it is important to evaluate the
287 chemical composition of the employed EO's, aiming to establish/correlate the results

288 obtained with the major compounds or the nature of the mixture that can be found in
289 these phytopharmaceuticals.

290 3.2. Antibiogram of the pathogens, MIC and MBC values

291 Prior to the evaluation of the antimicrobial activity of the EO, a conventional
292 antibiogram was performed to verify the presence of bacterial resistance to antibiotics
293 that are commonly used in veterinary practice. The results of this evaluation are
294 presented in Table 3.

295 Table 3 – Results of the conventional antibiogram for the studied pathogens.

Pathogen	Antibiotics											
	A MI	AM P	CP M	CR O	CT F	GE N	PE N	DO X	SU T	EN O	CI P	AM C
<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>	R	S	S	S	S	S	S	S	R	S	I	S
<i>Staphylococcus aureus</i>	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	S
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	S	R	I	R	R	R	R	R	S	S	I	S
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	S	R	S	S	R	S	R	R	R	S	S	R
<i>Escherichia coli</i>	S	S	S	S	S	S	R	S	S	S	I	S

296 AMI: amikacin; AMP: ampicillin; CPM: cefepime; CRO: ceftriaxone; CTF: ceftiofur; GEN:
297 gentamicin; PEN: penicillin G; DOX: doxycycline; SUT: cotrimoxazole; ENO: enrofloxacin; CIP:
298 ciprofloxacin; AMC: amoxicillin and clavulanate; R: Resistant; I: Intermediary; S: Susceptible.

299 According to Table 3, it was possible to observe that all of the collected bacteria
300 presented resistance to at least one of the antibiotics tested. The bacteria *K. pneumoniae*
301 and *P. aeruginosa* were the ones which have had the highest resistance to antibiotics;
302 five and six of the twelve tested antibiotics were ineffective on these species,
303 respectively. The pattern of bacterial resistance depends on several factors, such as the
304 history of previous treatments to which this animal was subjected, in addition to the
305 characteristics of the microorganism itself. Thus, there is no pattern of microbial
306 resistance to antibiotics, making it necessary to perform an antibiogram whenever
307 antibiotic therapy is to be used. The MIC and MBC values for the tested pathogens are
308 presented in Table 4.

309

310

311 Table 4 – Minimum inhibitory concentration (MIC; mg·mL⁻¹) and minimum bactericidal
 312 concentration (MBC; mg·mL⁻¹) of the essential oils of *O. basilicum*, *R. officinalis*, and *C. citratus*
 313 for the studied pathogens.

Pathogen	<i>O. basilicum</i>		<i>R. officinalis</i>		<i>C. citratus</i>	
	MIC	MBC	MIC	MBC	MIC	MBC
<i>Streptococcus equi zooepidemicus</i>	0.47	0.47	1.88	1.88	0.47	0.47
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.94	0.94	7.50	7.50	0.94	0.94
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	1.88	1.88	15.00	15.00	1.88	1.88
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>30	>30	>30	>30	>30	>30
<i>Escherichia coli</i>	0.94	0.94	3.75	3.75	3.75	7.50
<i>Candida albicans</i>	1.88	3.75	15.00	30.00	1.88	1.88

314 It is noteworthy that, even with a diverse chemical composition relative to the
 315 chemotypes, all EO's presented an antimicrobial effect against all of the tested
 316 pathogens. *P. aeruginosa* was the only pathogen that was not susceptible to any of the
 317 EO at the tested concentrations. However, it was noted that treated groups are capable
 318 to reduce bacterial growth of this specie, but not enough to be bacteriostatic. It is also
 319 important to observe that the EO of *R. officinalis* was effective at higher concentrations.
 320 This is probably due to the fact that the major compounds of the EO's have an
 321 antimicrobial effect, even if their concentrations vary relative to each extraction batch.

322 The EO compounds whose antimicrobial action is widely acknowledged are the
 323 phenolic compounds, however, other terpenes also have an own antimicrobial effect,
 324 and there is also the possibility of the presence of synergistic effects between the several
 325 EO components, enhancing the overall antimicrobial activity of the EO as a whole [41].
 326 Thus, possible synergistic effects between the substances may be determinant to trigger
 327 the mechanisms of cell death, slows/stops cell metabolism (biostatic effect), or render
 328 the cells of the pathogens non-viable [42].

329 3.3. Antimicrobial activity of the EO's at different concentrations

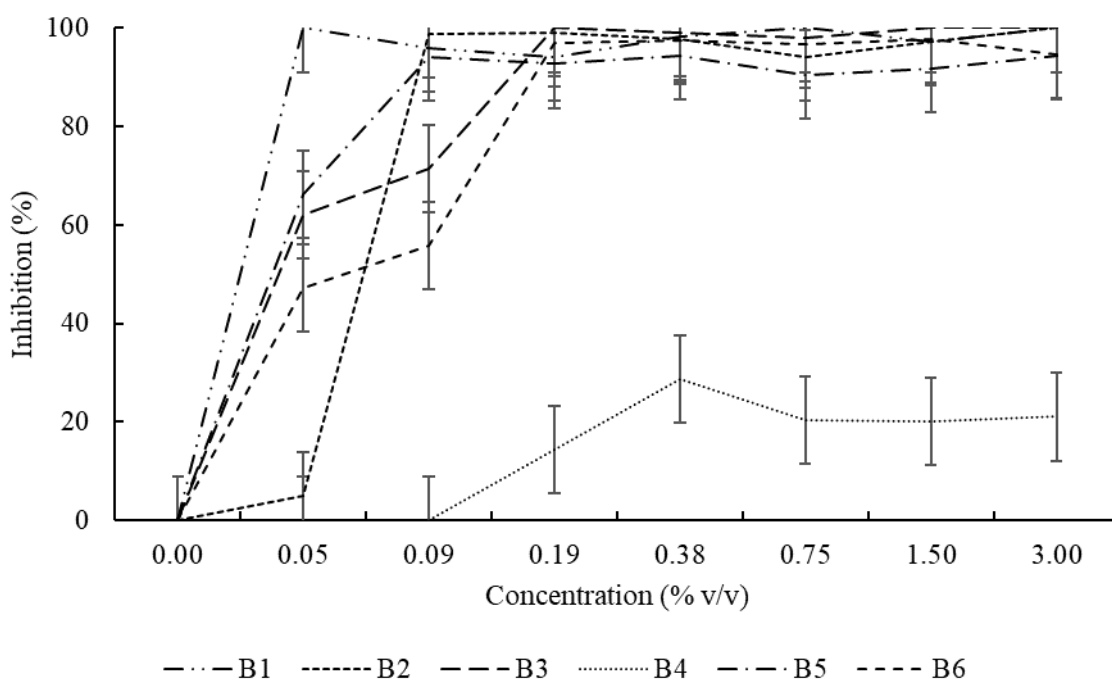
330 EO's are lipophilic substances, with low molecular weight, volatile, constituted
 331 mainly by terpenic molecules [40]. The volatility is the main property that differentiates
 332 them from fixed oil, which is extracted from seeds, although the chemical composition of
 333 EO's and fixed oils is largely unrelated. EO's are prone to oxidation and sensitive to air,
 334 moisture, and high temperatures, have a strong smell, and are nearly immiscible with

335 water [43,44]. Due to the very low water solubility, it is necessary to emulsify the EO's
 336 when carrying out tests in aqueous media. In the present study, Tween-80® was used as
 337 the surfactant following preliminary tests (unpublished data) that evaluated the use of
 338 Tween-80®, dimethyl sulfoxide (DMSO), and Triton®, aiming to verify which surfactant
 339 presented the better emulsion stability without interfering in the microbial growth.

340 The major compounds of EO's were present in very variable contents (54). In the
 341 present study, the major compounds of the EO's of *O. basilicum*, *R. officinalis*, and *C.*
 342 *citratus* corresponded to 59, 67, and 79% of the total oil compositions, respectively.

343 The EO of *O. basilicum* was effective against the pathogens at concentrations
 344 above 0.19% v/v (inhibition above 90%), with exception of *P. aeruginosa*, whose
 345 inhibition percentage at 3.00% v/v was approximately 15%. The inhibition percentages
 346 of each pathogen relative to the EO concentration for *O. basilicum* are presented in
 347 Figure 2.

348 Figure 2 – Growth inhibition curve the studied pathogens in microdilution test with *O.*
 349 *basilicum* EO.



350
 351
 352

B1: *Streptococcus equi zooepidemicus*; B2: *Staphylococcus aureus*; B3: *Klebsiella pneumoniae*;
 B4: *Pseudomonas aeruginosa*; B5: *Escherichia coli*; B6: *Candida albicans*.

353 Literature has reports that cite the major compounds of *O. basilicum* EO are
354 estragole, linalool, and eugenol, which have prominent antimicrobial activities [45,46].
355 Other studies report that linalol is the substance responsible for the antimicrobial activity
356 of the EO [47]. According with Prasad et al. (49) the antimicrobial activity of linalol is
357 restricted only to gram-positive bacteria; however, there are reports that linalool is
358 effective against both gram-positive and gram-negative bacteria [49]. As previously
359 observed, the variability of results is due to the action of several abiotic factors, however,
360 in most cases the EO presented an effective antimicrobial activity even when under
361 influence of this differences.

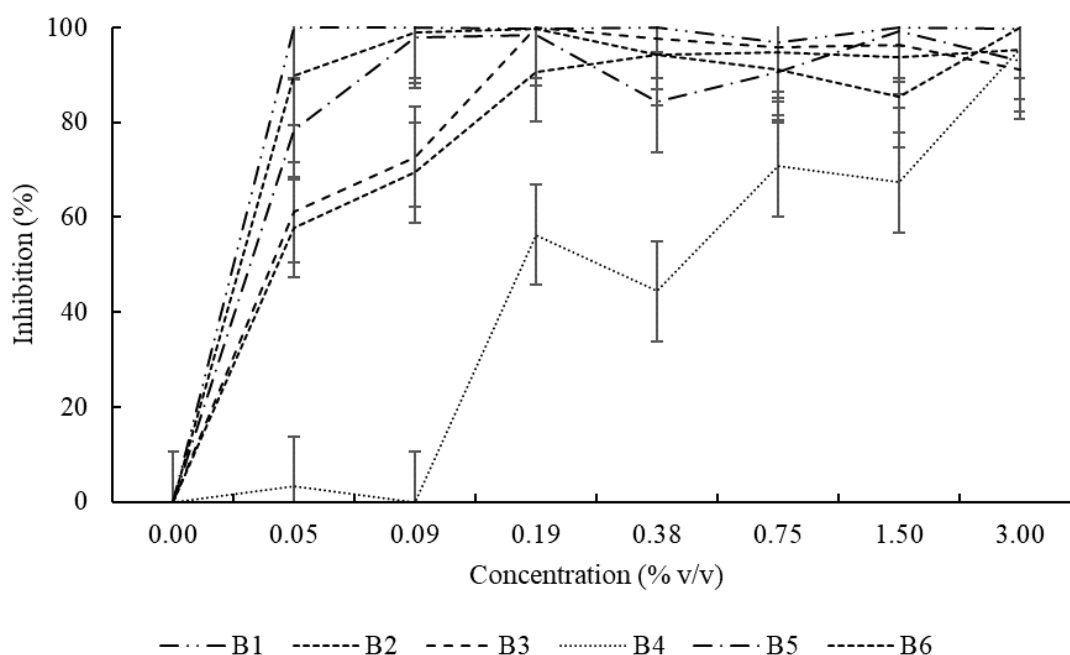
362 In the present study, the major compounds found in the *O. basilicum* EO were
363 linalyl acetate (33.32 wt.%), citronellal (25.06 wt.%), and thymol (11.67 wt.%). As can be
364 seen in Figure 2, the EO concentration of 0.18% v/v ($1.88 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) inhibited the growth
365 of all pathogens, with exception of *P. aeruginosa*. Moreover, this concentration killed all
366 pathogens, with exception of *C. albicans*, whose MBC value was $3.75 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$.

367 The essential oil of *C. citratus* was the most effective in the control of *P.*
368 *aeruginosa*, with an inhibition percentage of 95.50% at the highest concentration tested
369 (3.00% v/v), whereas the *O. basilicum* EO only presented an inhibition percentage of
370 28.70% at the same concentration (Figure 2). The inhibition percentages of each
371 pathogen relative to the EO concentration for *C. citratus* are presented in Figure 3.

372
373
374
375
376
377
378
379
380
381
382
383
384
385
386

387
388

Figure 3 – Growth inhibition curve the studied pathogens in microdilution test with *C. citratus* EO.



389
390
391
392

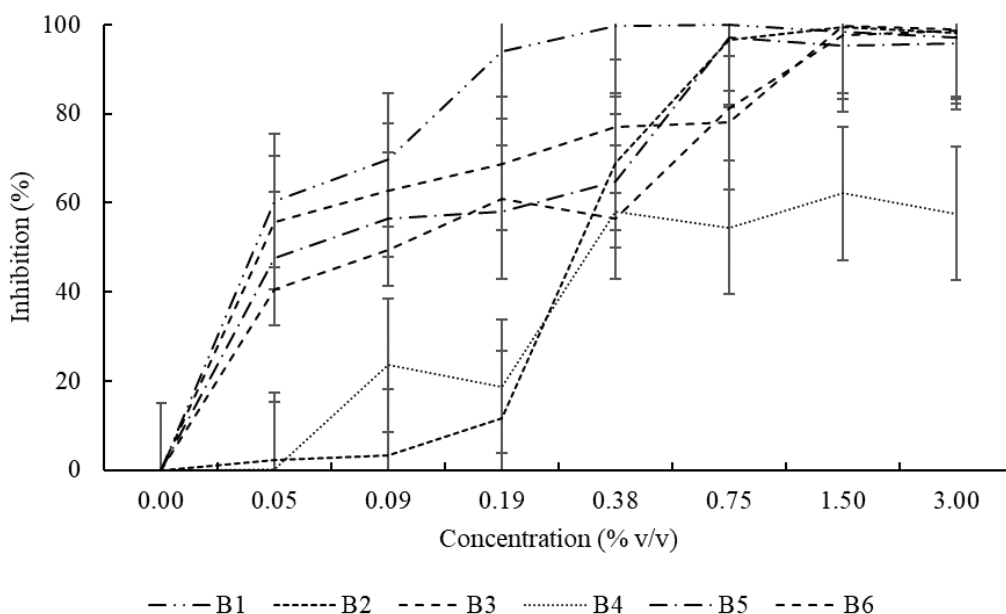
B1: *Streptococcus equi zooepidemicus*; B2: *Staphylococcus aureus*; B3: *Klebsiella pneumoniae*; B4: *Pseudomonas aeruginosa*; B5: *Escherichia coli*; B6: *Candida albicans*.

393

Among the EO's tested, the one from *C. citratus* has presented the highest inhibition percentages. Its major compounds were geranial and neral (citral), with 45.96 and 32.62 wt.%, respectively. These two isomers compose citral, which has inhibitory effect on gram-positive and negative bacteria [50]. This compound affects the biologic oxidative reactions and the Krebs cycle, not only influencing the mitochondrial functionality, but also causing the non-functional aggregation of proteinaceous macromolecules, leading to cellular metabolic disturbances [51]. This phytopharmaceutical was the only that has had a high inhibition percentage of *P. aeruginosa*, in which the concentration of 30 mg·mL⁻¹ (3.00% v/v) inhibited about 95% of the bacterial growth (Figure 3). However, in the resazurin test, the same concentration had a change in color, indicating the presence of cell activity. Thus, the EO acted mostly as a bacteriostatic, rather than an antibiotic. Since this species still presented a pathogenic potential even after exposed to the EO, higher concentrations may be needed to carry out an effective control of this pathogen.

407 Relative to the EO of *R. officinalis*, the inhibition curve was different for *S. aureus*
 408 than for the other two EO's, controlling this species only from 1.50% v/v on; other
 409 pathogens that were controlled at concentrations as lower as 0.05-0.09% v/v when
 410 exposed to the other EO's were only controlled by *R. officinalis* EO at concentrations
 411 above 0.38-0.75% v/v. The inhibition percentages of each pathogen relative to the EO
 412 concentration for *R. officinalis* are presented in Figure 4.

413 Figure 4 – Growth inhibition curve the studied pathogens in microdilution test with *R.*
 414 *officinalis* EO.



415 B1: *Streptococcus equi zooepidemicus*; B2: *Staphylococcus aureus*; B3: *Klebsiella pneumoniae*;
 416 B4: *Pseudomonas aeruginosa*; B5: *Escherichia coli*; B6: *Candida albicans*.
 417

418 The EO of *R. officinalis* presented a poorer performance relative to the other EO's
 419 tested. However, despite the higher concentrations required for *R. officinalis* EO to
 420 control species that were readily controlled by the other EOs, *P. aeruginosa* presented
 421 an inhibition percentage of approximately 60% at the concentration of 3.00% v/v, quite
 422 higher than the inhibition percentage observed for *O. basilicum* at the same
 423 concentration (approx. 15%). It is important to take into account that *P. aeruginosa* has
 424 presented the lowest inhibition percentages for all EO, and also has had the highest
 425 degree of resistance in the antibiogram. These differences of microbial susceptibility may

426 be attributed to the diffusion/penetration rate of the terpenes in the cell wall and
427 membrane of the pathogens [52].

428 In this study, the major compounds detected in the *R. officinalis* EO were borneol
429 (26.48 wt.%), trans- β -ocimene (16.76 wt.%), camphene (12.45 wt.%), and α -
430 phellandrene (11.08 wt.%). This composition is diverse from the one reported by Jiang
431 et al. [53], who observed 1,8-cineole (26.54 wt.%), α -pinene (20.14 wt.%), camphor
432 (12.88 wt.%), and camphene (11.38 wt.%) as the major compounds. Although only the
433 camphene content was similar in both studies, the MIC and MBC values were also similar
434 in both works, since the *R. officinalis* EO presented antimicrobial effect in both studies.
435 The same authors compared the antimicrobial effects of this EO with 1,8-cineole and α -
436 pinene produced by chemical synthesis. The EO has had a stronger antimicrobial effect
437 than the isolated substances, indicating that synergistic effects between the EO
438 components may be determinant for the overall efficacy of the EO as antimicrobial
439 agents.

440 Friedman et al. [54] classified the EO's and EO components as fast-acting and
441 slow-acting according with the time they take to obtain a significative effect on the
442 microorganisms. EO's that have carvacrol, cinnamaldehyde, and geraniol are
443 considered as fast-acting, considering they inactivate microorganisms such as *E. coli*
444 and *Salmonella* sp. within five minutes. On the other hand, the EO's and EO compounds
445 that take up to 60 min to demonstrate an antimicrobial effect are considered as slow-
446 acting [54].

447 The EO's may also act as enhancers of antimicrobial activity, fostering the action
448 of synthetic antibiotics when antibiotic resistance has arisen or as virulence attenuators,
449 possibly by modulating the response of the immune system of the host organism against
450 the infection [55].

451

452

453 5. Conclusion

454 According to the data observed, the EO's of *O. basilicum* (basil), *R. officinalis*
455 (rosemary), and *C. citratus* (lemongrass) have presented antimicrobial activity, in
456 different levels, against pathogenic species that cause endometritis in mares. Other
457 studies must be carried out to elucidate the mechanism of action of the terpenes tested,
458 as well as their time of action to develop procedures and products for *in vivo* application
459 of these substances.

460 References

- 461 [1] Colbern GT, Voss JL, Squires EL, Ellis RP, Shideler RK, McChesney AE.
462 Development of a model to study endometritis in mares. J Equine Vet Sci
463 1987;7:73–6. doi:10.1016/S0737-0806(87)80034-5.
- 464 [2] Leblanc M, Causey R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both
465 threats to fertility. Reprod Domest Anim 2009;44:10–22. doi:10.1111/j.1439-
466 0531.2009.01485.x.
- 467 [3] Troedsson MH. Endometritis. Equine Reprod. 2nd, 2011, p. 2608–19.
- 468 [4] Riddle WT, LeBlanc MM, Stromberg AJ. Relationships between uterine culture,
469 cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. Theriogenology
470 2007;68:395–402. doi:10.1016/j.theriogenology.2007.05.050.
- 471 [5] Canisso IF, Segabinazzi LGTM, Fedorka CE. Persistent breeding-induced
472 endometritis in mares - a multifaceted challenge: From clinical aspects to
473 immunopathogenesis and pathobiology. Int J Mol Sci 2020;21.
474 doi:10.3390/ijms21041432.
- 475 [6] Ferris RA. Therapeutics for Infectious Endometritis: A Clinical Perspective. Rev
476 Bras Reprod Anim 2017:175–9.
- 477 [7] Katila T. Uterine defence mechanisms in the mare. Anim Reprod Sci
478 1996;42:197–204.

- 479 [8] Brinsko S, Blanchard, Thery; Dickson, Varner; Schumacher, J.; Love, Charles;
480 Hinrichs, Katrine; Hartman D. Manual of Equine Reproduction. 3rd ed. Maryland
481 Heights: Mosby Elsevier; 2011.
- 482 [9] LeBlanc MM. The current status of antibiotic use in equine reproduction. *Equine*
483 *Vet Educ* 2009;21:156–67. doi:10.2746/095777308X357621.
- 484 [10] Segabinazzi LG, Friso AM, Correal SB, Crespilho AM, Dell’Aqua JA, Miró J, et
485 al. Uterine clinical findings, fertility rate, leucocyte migration, and COX-2 protein
486 levels in the endometrial tissue of susceptible mares treated with platelet-rich
487 plasma before and after AI. *Theriogenology* 2017;104:120–6.
488 doi:10.1016/j.theriogenology.2017.08.007.
- 489 [11] Montechiesi, D., Ignácio FS. OZONIOTERAPIA LOCAL PARA TRATAMENTO
490 DE INFECÇÃO. II Simpósio Int. Ozonioterapia Veterinária, vol. 4, São Paulo:
491 2018, p. 2175.
- 492 [12] Alvarenga MA, do Carmo MT, Segabinazzi LG, Guastali MD, Maia L, Landim-
493 Alvarenga FC. Feasibility and Safety of Endometrial Injection of Autologous
494 Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells in Mares. *J Equine Vet Sci* 2016;42:12–
495 8. doi:10.1016/j.jevs.2016.03.002.
- 496 [13] Dell Aqua Jr JA, Papa FO, Lopes MD, Alvarenga MA, Macedo LP, Melo CM.
497 Modulation of acute uterine inflammatory response after artificial insemination
498 with equine frozen semen. *Anim Reprod Sci* 2006;94:270–3.
499 doi:10.1016/j.anireprosci.2006.03.061.
- 500 [14] Bucca S, Carli A, Buckley T, Dolci G, Fogarty U. The use of dexamethasone
501 administered to mares at breeding time in the modulation of persistent mating
502 induced endometritis. *Theriogenology* 2008;70:1093–100.
503 doi:10.1016/j.theriogenology.2008.06.029.
- 504 [15] Fedorka CE, Scoggin KE, Woodward EM, Squires EL, Ball BA, Troedsson MHT.
505 The effect of select seminal plasma proteins on endometrial mRNA cytokine
506 expression in mares susceptible to persistent mating-induced endometritis.

- 507 Reprod Domest Anim 2017;52:89–96. doi:10.1111/rda.12813.
- 508 [16] Rogan D, Fumuso E, Rodríguez E, Wade J, Bruni SFS. Use of a Mycobacterial
509 Cell Wall Extract (MCWE) in Susceptible Mares to Clear Experimentally Induced
510 Endometritis With *Streptococcus zooepidemicus*. J Equine Vet Sci 2007;27:112–
511 7. doi:10.1016/j.jevs.2007.01.010.
- 512 [17] Lisboa FP, Martins GV, Novello G, França RT, Delamare APL, Pauletti GF.
513 Fitoterápicos como Alternativa de Controle para Bactérias Causadoras de
514 Endometrite em Éguas. XVIII Conferência Anu. da Abraveq, 2017, p. 100–1.
- 515 [18] Murbach Teles Andrade BF, Nunes Barbosa L, Da Silva Probst I, Fernandes
516 Júnior A. Antimicrobial activity of essential oils. J Essent Oil Res 2014;26:34–40.
517 doi:10.1080/10412905.2013.860409.
- 518 [19] Reddy DN. Essential oils extracted from medicinal plants and their applications.
519 Nat. Bio-active Compd. Prod. Appl. vol 1, 2019, p. 283.
- 520 [20] CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ DC. Óleos Essenciais e Química Fina. Quim Nova
521 1993;16:224–8.
- 522 [21] Kaloustian J, Chevalier J, Mikail C, Martino M, Abou L, Vergnes MF. Étude de
523 six huiles essentielles: Composition chimique et activité antibactérienne.
524 Phytotherapie 2008;6:160–4. doi:10.1007/s10298-008-0307-1.
- 525 [22] Burt S. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in
526 foods - A review. Int J Food Microbiol 2004;94:223–53.
527 doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2004.03.022.
- 528 [23] Stefanakis MK, Touloupakis E, Anastasopoulos E, Ghanotakis D,
529 Katerinopoulos HE, Makridis P. Antibacterial activity of essential oils from plants
530 of the genus *Origanum*. Food Control 2013;34:539–46.
531 doi:10.1016/j.foodcont.2013.05.024.
- 532 [24] Ojeda-Sana AM, van Baren CM, Elechosa MA, Juárez MA, Moreno S. New
533 insights into antibacterial and antioxidant activities of rosemary essential oils and
534 their main components. Food Control 2013;31:189–95.

- 535 doi:10.1016/j.foodcont.2012.09.022.
- 536 [25] Benko T, Boldizar M, Novotny F, Hura V, Valocky I, Dudrikova K, et al. Incidence
537 of bacterial pathogens in equine uterine swabs, their antibiotic resistance
538 patterns, and selected reproductive indices in English thoroughbred mares
539 during the foal heat cycle. *Vet Med (Praha)* 2015;60:613–20. doi:10.17221/8529-
540 VETMED.
- 541 [26] Lopez-Romero JC, González-Ríos H, Borges A, Simões M. Antibacterial Effects
542 and Mode of Action of Selected Essential Oils Components against *Escherichia*
543 *coli* and *Staphylococcus aureus*. *Evidence-Based Complement Altern Med*
544 2015;2015. doi:10.1155/2015/795435.
- 545 [27] Bizzini A, Durussel C, Bille J, Greub G, Prod'hom G. Performance of matrix-
546 assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry for
547 identification of bacterial strains routinely isolated in a Clinical Microbiology
548 Laboratory. *J Clin Microbiol* 2010;48:1549–54. doi:10.1128/JCM.01794-09.
- 549 [28] Clinical and Laboratory Standards Institute. Performance standards for
550 antimicrobial susceptibility testing 2019;23.
- 551 [29] Adams RP. Identification of essential oil components by gas
552 chromatography/mass spectrometry. 4th ed. Waco, TX, USA: Allured publishing;
553 2017.
- 554 [30] Mann CM, Markham JL. A new method for determining the minimum inhibitory
555 concentration of essential oils. *J Appl Microbiol* 1998;84:538–44.
556 doi:10.1046/j.1365-2672.1998.00379.x.
- 557 [31] Sutili CM, Mazzuchini MP, Novello G, Battasini GV, Martins GV, Pauletti GF, et
558 al. Óleo essencial de Aroeira e Erva-Cidreira como alternativa de controle de
559 bactérias causadoras de endometrite. II Congr. REPROLAB Reprodução
560 Equina, Porto Alegre: 2019, p. 97.
- 561 [32] Lisboa FP, Martins GV, Scheeren VF da C, Novello G, Delamare APL, Pauletti
562 GF, et al. Fitoterápicos como alternativa de controle para bactérias causadoras

- 563 de vesiculite seminal em garanhões. XIX Conferência Anu. da Abraveq,
564 Campos Do Jordão: 2018, p. 108–9.
- 565 [33] Novello G, Martins GV, França RT, Bandeira R dos S, Pauletti GF, Delamare
566 APL, et al. Atividade Antifúngica de óleos essenciais sobre *Candida* sp. isolada
567 do útero de égua. XVIII Conferência Anu. da Abraveq, 2017, p. 139–40.
- 568 [34] Muráriková A, Ťažký A, Neugebauerová J, Planková A, Jampílek J, Mučaji P, et
569 al. Characterization of Essential Oil Composition in Different Basil Species and
570 Pot Cultures by a GC-MS Method. *Molecules* 2017;22.
571 doi:10.3390/molecules22071221.
- 572 [35] Silvestre WP, Medeiros FR, Agostini F, Toss D, Pauletti GF. Fractionation of
573 rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) essential oil using vacuum fractional
574 distillation. *J Food Sci Technol* 2019;56:5422–34. doi:10.1007/s13197-019-
575 04013-z.
- 576 [36] Atti-Santos AC, Rossato M, Pauletti GF, Rota LD, Rech JC, Pansera MR, et al.
577 Physico-chemical evaluation of *Rosmarinus officinalis* L. Essential oils. *Brazilian*
578 *Arch Biol Technol* 2005;48:1035–9. doi:10.1590/S1516-89132005000800020.
- 579 [37] Jamshidi R, Afzali Z, Afzali D. Chemical composition of hydrodistillation essential
580 oil of rosemary in different origins in Iran and comparison with other countries.
581 *Am J Agric Environ Sci* 2009;5:78–81.
- 582 [38] Tajidin NE. Chemical composition and citral content in lemongrass
583 (*Cymbopogon citratus*) essential oil at three maturity stages. *AFRICAN J*
584 *Biotechnol* 2012;11. doi:10.5897/AJB11.2939.
- 585 [39] Costa LC do B, Corrêa RM, Cardoso JCW, Pinto JEBP, Bertolucci SKV, Ferri
586 PH. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do
587 óleo essencial de capim-limão. *Hortic Bras* 2005;23:956–9. doi:10.1590/s0102-
588 05362005000400019.
- 589 [40] Morais LAS De. Influência Dos Fatores Abióticos Na Composição Química Dos
590 Óleos Essenciais. *Hortic Bras* 2009;27:4050–63.

- 591 [41] Godinho GC. ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DO
592 MANJERICÃO. Fundação Educacional do Município de Assis, 2012.
- 593 [42] Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. Biological effects of essential
594 oils - A review. Food Chem Toxicol 2008;46:446–75.
595 doi:10.1016/j.fct.2007.09.106.
- 596 [43] CMO, SIMÕES; V S. Óleos Voláteis. Farmacogn. da planta ao Medicam., ED
597 UFSC; 1999, p. 415.
- 598 [44] ML, SAITO; S S. Plantas aromáticas e seu uso na agricultura. Embrapa Meio
599 Ambiente; 2000.
- 600 [45] Hussain AI, Anwar F, Hussain Sherazi ST, Przybylski R. Chemical composition,
601 antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils
602 depends on seasonal variations. Food Chem 2008;108:986–95.
603 doi:10.1016/j.foodchem.2007.12.010.
- 604 [46] Omidbaigi R, Hassani A, Sefidkon F. Essential oil content and composition of
605 sweet basil (*ocimum basilicum*) at different irrigation regimes. J Essent Oil-
606 Bearing Plants 2003;6:104–8. doi:10.1080/0972-060X.2003.10643335.
- 607 [47] Ravid U, Putievsky E, Katzir I, Lewinsohn E. Enantiomeric composition of linalol
608 in the essential oils of *Ocimum* species and in commercial basil oils. Flavour
609 Fragr J 1997;12:293–6. doi:10.1002/(SICI)1099-1026(199707)12:4<293::AID-
610 FFJ648>3.0.CO;2-3.
- 611 [48] G PRASAD; A KUMAR; AK SINGH; AK BHATTACHARYA KSVS. Antimicrobial
612 activity of essential oils of some *Ocimum* species and clove oil. Fitoterapia
613 1986;57:429–32.
- 614 [49] Moghaddam AMD, Shayegh J, Mikaili P, Sharaf JD. Antimicrobial activity of
615 essential oil extract of *Ocimum basilicum* L. leaves on a variety of pathogenic
616 bacteria. J Med Plants Res 2011;5:3453–6.
- 617 [50] Argyropoulou C, Daferera D, Tarantilis PA, Fasseas C, Polissiou M. Chemical
618 composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K.

- 619 (Verbenaceae) at two developmental stages. *Biochem Syst Ecol* 2007;35:831–7.
620 doi:10.1016/j.bse.2007.07.001.
- 621 [51] Luo M, Jiang LK, Huang YX, Xiao M, Li B, Zou GL. Effects of citral on
622 *Aspergillus flavus* spores by quasi-elastic light scattering and multiplex
623 microanalysis techniques. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2004;36:277–
624 83. doi:10.1093/abbs/36.4.277.
- 625 [52] Cox SD, Mann CM, Markham JL, Bell HC, Gustafson JE, Warmington JR, et al.
626 The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*
627 (Tea tree oil). *J Appl Microbiol* 2000;88:170–5. doi:10.1046/j.1365-
628 2672.2000.00943.x.
- 629 [53] Jiang Y, Wu N, Fu YJ, Wang W, Luo M, Zhao CJ, et al. Chemical composition
630 and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. *Environ Toxicol*
631 *Pharmacol* 2011;32:63–8. doi:10.1016/j.etap.2011.03.011.
- 632 [54] Friedman M, Henika PR, Levin CE, Mandrell RE. Antibacterial activities of plant
633 essential oils and their components against *Escherichia coli* O157:H7 and
634 *Salmonella enterica* in apple juice. *J Agric Food Chem* 2004;52:6042–8.
635 doi:10.1021/jf0495340.
- 636 [55] González-Lamothe R, Mitchell G, Gattuso M, Diarra MS, Malouin F, Bouarab K.
637 Plant antimicrobial agents and their effects on plant and human pathogens. *Int J*
638 *Mol Sci* 2009;10:3400–19. doi:10.3390/ijms10083400.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

CONSIDERAÇÕES FINAIS

- ❖ Todos os óleos essenciais apresentaram capacidade bacteriostática e bactericida.
- ❖ Foi possível determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e concentração bactericida mínima (CBM) de todos os óleos essenciais para todos microrganismos, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*.
- ❖ O óleo essencial (OE) que apresentou maior potencial inibitório foi o Capim-limão, entretanto, os resultados de CIM e CBM variaram de acordo com o tipo de OE, sua concentração e patógeno testado.
- ❖ Os OE foram capazes de combater bactérias que apresentavam resistência à antibióticos comumente utilizados na rotina clínica.