

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E ENGENHARIAS - CCAE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS**

**PRISCILA DE OLIVEIRA LORENZONI**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FENÓIS NATURAIS CONTRA  
MICROORGANISMOS ISOLADOS DO TRATO GENITAL DE ÉGUAS**

**ALEGRE – ES**

**2021**

**PRISCILA DE OLIVEIRA LORENZONI**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FENÓIS NATURAIS CONTRA  
MICRORGANISMOS ISOLADOS DO TRATO GENITAL DE ÉGUAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico Cirúrgicas.

Orientador: Prof. Dr.: Vagner Tebaldi de Queiroz

**ALEGRE – ES**

**2021**

**PRISCILA DE OLIVEIRA LORENZONI**

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FENÓIS NATURAIS CONTRA  
MICROORGANISMOS ISOLADOS DO TRATO GENITAL DE ÉGUAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias do Centro de Ciências Agrárias e Engenharia da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Ciências Veterinárias, linha de pesquisa em Diagnóstico e Terapêutica das Enfermidades Clínico-Cirúrgicas.

Aprovado em \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof. Dr. Vagner Tebaldi de Queiroz**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientador**

---

**Prof. Dr. José de Oliveira Carvalho Neto**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**

---

**Prof. Dr. Tiago Antônio de Oliveira Mendes**  
**Universidade Federal de Viçosa**

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me proteger até aqui do vírus causador da pandemia mundial que estamos vivendo. Por ter me dado forças, em meio a tantas dificuldades e me mostrado os melhores caminhos, a fim de que eu pudesse chegar até aqui e não desistisse dos meus sonhos.

Ao meu filho, Davi, por ser mais uma motivação e trazer alegria e aconchego nesse período pandêmico. À minha mãe Cenira Andrade de Oliveira, por me apoiar e incentivar a entrar no mestrado e pelo carinho maternal inigualável. Ao meu pai, Luiz Leôncio Lorenzoni, pelo apoio e conselhos valiosos. Aos meus irmãos, Pedro e Paula, por estarem presentes, mesmo que à distância, em todos os momentos.

Ao meu orientador Vagner Tebaldi de Queiroz, por ter me perguntado, logo no início do curso, com o que eu queria trabalhar, dando oportunidade de escolher uma das minhas paixões dentro da medicina veterinária, e por todo apoio dado durante a pesquisa.

À minha coorientadora Delia Chaves, por ter aceitado ajudar na pesquisa e entrar nesse mundo diferente da reprodução equina e também pelos conselhos amigáveis.

À minha família Alegrense, que não é de sangue, mas sempre esteve comigo nos momentos felizes e difíceis, seria impossível citar todos.

Ao professor Tiago Antônio de Oliveira Mendes, por ter permitido que essa pesquisa acontecesse abrindo as portas do Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa (LBM-UFV) e pelo apoio técnico e teórico.

Às profissionais, que se tornaram colegas, do LBM-UFV, Ramila e Ananda.

Ao Mário Itho por também ter tornado possível essa pesquisa, cedendo os animais para o estudo e pelos ensinamentos dentro da reprodução equina.

Aos colegas do Laboratório de Química 1 da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), pela ajuda, incentivo e apoio. Serei sempre grata a todos.

À UFES, que foi minha segunda casa durante 8 anos, e proporcionou ferramentas essenciais para trilhar minha carreira profissional.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

*“Nunca será tarde enquanto um problema for  
uma oportunidade.”*

- Braza

## RESUMO

LORENZONI, PRISCILA DE OLIVEIRA. **ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FENÓIS NATURAIS CONTRA MICRORGANISMOS ISOLADOS DO TRATO GENITAL DE ÉGUAS**. 2021. 52p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharias - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2021.

A endometrite é uma das principais causas de infertilidade em éguas, gerando perdas econômicas no setor de reprodução equina. A dificuldade no tratamento dessa enfermidade está relacionada ao surgimento de cepas resistentes e à gama limitada de medicamentos disponíveis para uso específico no trato genital de éguas. A necessidade de um medicamento multifacetado, que atue sobre fungos e bactérias, aponta para a descoberta de novos ingredientes ativos. Dessa forma, o estudo se concentra no estudo das propriedades antibacterianas e antifúngicas de timol e carvacrol, cujo objetivo foi analisar a atividade antimicrobiana destes fenóis naturais sobre microrganismos isolados do útero de éguas. No experimento, amostras uterinas de éguas receptoras de embrião (n=38) foram coletadas para análise microbiológica e citologia endometrial. Os microrganismos isolados foram identificados por sequenciamento de DNA e a sensibilidade dos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus sciuri* e *Rhodulotora glutinis* ao timol ou carvacrol foi avaliada por ensaios de microdiluição em caldo. Nos resultados foi possível inferir que 55,26% (n=21) dos animais tiveram amostras com crescimento microbiológico, ou seja, apresentavam endometrite. O sequenciamento de DNA identificou 12 espécies distintas, sendo 80% bactérias e 20% fungos ou leveduras. O microrganismo mais frequente foi *E. coli* (50%). Timol e carvacrol apresentaram efeito bactericida contra *E. coli*, *S. sciuri* e fungicida contra *R. glutinis* isolados do útero de éguas. Já os valores de concentração inibitória média (IC<sub>50</sub>) para timol / carvacrol foram, respectivamente, 0,101 / 0,076 mg/mL para *E. coli*, 0,192 / 0,197 mg/mL para *S. Sciuri* e 0,0378 / 0,0331 mg/mL para *R. glutinis*. Os resultados observados neste estudo enfatizam o potencial destes fenóis naturais como uma alternativa de abordagem terapêutica contra isolados uterinos resistentes a outras drogas ou formulações disponíveis para o tratamento da endometrite.

Palavras-chave: carvacrol, endometrite, sequenciamento de DNA, timol.

## ABSTRACT

LORENZONI, PRISCILA DE OLIVEIRA. **ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NATURAL PHENOLS AGAINST MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE GENITAL TRACT OF MARES.** 2021. 58p. Thesis (Master's Degree in Veterinary Science) - Centro de Ciências Agrárias e Engenharia - CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, ES, 2021.

Endometritis is one of the main causes of infertility in mares, generating economic losses in the equine reproduction sector. The difficulty in treating this disease is related to the emergence of resistant strains and the limited range of drugs available for specific use in the genital tract of mares. The need for a multifaceted medicine points to the discovery of new active ingredients. Thus, the study focuses on the study of antibacterial and antifungal properties of thymol and carvacrol, whose objective was to analyze the antimicrobial activity of these natural phenols on microorganisms isolated from the uterus of mares. In the experiment, uterine samples from embryo recipient mares (n=38) were collected for microbiological analysis and endometrial cytology. Isolated microorganisms were identified by DNA sequencing and the sensitivity of the microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus sciuri* and *Rhodulotora glutinis* to thymol or carvacrol was evaluated by microdilution assays in broth. In the results, it was possible to infer that 55.26% (n=21) of the animals had samples with microbiological growth, that is, they had endometritis. DNA sequencing identified 12 distinct species, 80% of which were bacteria and 20% fungi or yeasts. The most frequent microorganism was *E. coli* (50%). Thymol and carvacrol showed bactericidal effect against *E. coli*, *S. sciuri* and fungicidal effect against *R. glutinis* isolated from the uterus of mares. The mean inhibitory concentration values (IC<sub>50</sub>) for thymol / carvacrol were, respectively, 0.101 / 0.076 mg/mL for *E. coli*, 0.192 / 0.197 mg/mL for *S. Sciuri* and 0.0378 / 0.0331 mg/mL for *R. glutinis*. The results observed in this study emphasize the potential of these natural phenols as an alternative therapeutic approach against uterine isolates resistant to other drugs or formulations available for the treatment of endometritis.

Keywords: carvacrol, endometritis, DNA sequencing, thymol.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>10</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>12</b>
2.1	Endometrite em éguas.....	12
2.1.1	Métodos de diagnóstico.....	15
2.1.2	Tratamento.....	18
2.1.3	Resistência à medicamentos antibióticos e antifúngicos.....	21
2.2	Controle alternativo de infecções em animais de grande porte utilizando fenóis naturais.....	22
<b>3</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>26</b>
<b>CAPÍTULO 1: Atividade antimicrobiana de fenóis naturais contra microrganismos isolados do trato genital de éguas</b>		
<b>RESUMO</b>		
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>35</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
4.1	Seleção das éguas do estudo.....	36
4.2	Coleta de amostras uterinas para análises .....	37
4.3	Avaliação citológica e microbiológica.....	37
4.4	Identificação dos microrganismos.....	38
4.5	Análise da filogenética.....	39
4.6	Compostos fenólicos.....	39
4.7	Preparo do inóculo.....	39
4.8	Teste de microdiluição em caldo.....	40
4.9	Determinação do IC <sub>50</sub> .....	40
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>41</b>
5.1	Incidência de endometrite .....	41
5.2	Isolados identificados por sequenciamento de DNA.....	41
5.3	Árvore filogenética dos isolados de <i>E. coli</i> .....	43
5.4	Atividade antimicrobiana de timol e carvacrol.....	44
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>49</b>



## 1. INTRODUÇÃO

A renda gerada no complexo do agronegócio do cavalo no Brasil foi de R\$ 16,15 bilhões/ano, segundo dados gerados pelo MAPA (2016). Neste cenário, 46% da renda dos criadores de equinos provém de atividades relacionadas à reprodução sendo que do total deste valor, 50% provém da inseminação artificial e 33,3% da transferência de embriões (VIEIRA, 2011). Dessa forma, torna-se fundamental a manutenção da saúde reprodutiva desses animais, entretanto algumas enfermidades podem comprometer a fertilidade em éguas (SIEME et al., 2018).

Dentre as enfermidades, a endometrite é a causa mais comum de infertilidade e subfertilidade em éguas, o que gera grandes perdas econômicas no setor da reprodução equina (CAUSEY, 2006; LEBLANC; CAUSEY, 2009; PASOLINI et al., 2016). As endometrites são alterações inflamatórias agudas ou crônicas do endométrio uterino, as quais podem, ou não, estar associadas à presença de patógenos (LEBLANC; CAUSEY, 2009).

Com a alta incidência da doença e dificuldade de tratamento, há o surgimento novas cepas de microrganismos causadores da doença, muitas vezes resistentes aos medicamentos disponíveis atualmente (BENKO et al., 2015; DÍAZ-BERTRANA et al., 2021). Com isto, é necessário o investimento na pesquisa de novos medicamentos de uso específico para o tratamento da enfermidade.

Estas endometrites, causadas por diferentes agentes etiológicos, podem ter sua origem no momento da monta natural, inseminação artificial ou durante o manejo reprodutivo, com a limpeza local ou dos instrumentos utilizados sendo realizada de maneira inadequada (MCCUE; FERRIS, 2016).

Assim, mesmo com o desenvolvimento da indústria farmacêutica veterinária, um setor em ascensão, cujo aumento da receita líquida de vendas de medicamentos veterinários no Brasil entre os anos de 1996-2014 foi de 613,4% (RODRIGUES; COSTA; KISS, 2018). Ainda é restrito o número de medicamentos e formulações específicas para o tratamento local da endometrite em éguas no país.

Além do mais, existe ainda a dificuldade de tratamento devido as cepas de microrganismos resistentes a estes medicamentos (DÍAZ-BERTRANA et al., 2021). Dessa forma, a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos a partir de outros ingredientes ativos, e uma fonte alternativa de novos ativos com propriedades biológicas são os produtos naturais, como as plantas medicinais é uma realidade (EBANI et al., 2021; PAIANO et al., 2020; SHARIFZADEH; SHOKRI, 2021).

Além dos óleos essenciais de plantas, os ativos isolados como os fenóis naturais são uma opção para o tratamento de infecções reprodutivas em equinos. Estes compostos apresentaram grande potencial bactericida e fungicida quando avaliados *in vitro* em fungos e bactérias isolados do trato genital de éguas (EBANI et al., 2021; SHARIFZADEH; SHOKRI, 2020), além de sinergia com medicamentos já utilizados na rotina clínica desses animais (SHARIFZADEH; SHOKRI, 2021).

Neste contexto, apesar de ainda serem poucos, os estudos relacionados ao uso de produtos naturais no tratamento da endometrite equina, alguns compostos têm obtido resultados promissores nos tratamentos de enfermidades na medicina veterinária, como os fenóis naturais timol e carvacrol. Estes compostos foram eficazes contra microrganismos causadores de mastite bovina, endometrite bovina, doenças respiratórias, pitiose equina, além do alto potencial antioxidante e antiinflamatório, também já comprovado.

O timol e o carvacrol são isômeros aromáticos que possuem alto poder de penetração na pele e mucosas, tornando-os uma boa aposta medicação de aplicação local. No entanto, ainda são escassos e necessários mais estudos *in vitro* e *in vivo* visando o tratamento da endometrite equina utilizando estes compostos.

Neste âmbito, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos fenóis naturais timol e carvacrol contra microrganismos causadores de endometrite isolados do útero de éguas.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Endometrite em éguas

Para compreender como a endometrite se instala, é importante ter conhecimento dos mecanismos fisiológicos e de defesa do aparelho reprodutor das éguas. O útero apresenta barreiras físicas de proteção contra patógenos, compostas pela vulva, vestibulo, vagina e a cérvix (LEBLANC; CAUSEY, 2009). A vagina equina apresenta microflora natural, contendo bactérias produtoras de ácido láctico, que atuam como barreira biológica por inibir a proliferação de microrganismos patogênicos passíveis de serem carreados para o útero (FRAGA et al., 2008).

Já o ambiente uterino é desprovido de microflora natural, sendo a defesa imunológica uterina frente aos microrganismos iniciada pelo ataque local desses agentes pelos leucócitos. Subseqüentemente ocorre a eliminação e neutralização via anticorpos, além da remoção física através da cérvix e via linfática (TROEDSSON, 1999).

A cérvix é a principal barreira física de proteção uterina, localiza-se entre o canal vaginal e o útero, dessa forma, o período de de maior incidência de contaminação, seja pela própria inseminação ou infecção ascendente

(LEBLANC, 2008a), ocorre durante o estro, período no qual a cérvix permanece relaxada devido a ação hormonal, permitindo comunicação entre o canal vaginal e o útero.

As éguas são poliéstricas estacionais, apresentando atividade sexual durante os períodos de maior incidência solar (primavera-verão). Durante este período o ciclo estral da égua dura em média 21 dias e a fase correspondente ao estro dura aproximadamente x dias.

Fisiologicamente, ocorre um processo inflamatório após a inseminação, seja por monta natural ou inseminação artificial. O propósito deste mecanismo é limpar o útero de excedentes seminais, como espermatozoides defeituosos e/ou inviáveis, plasma seminal, diluentes de sêmen e microrganismos (LEBLANC et al., 2010). Após a ovulação, quando a cérvix encontra-se fechada, as contrações uterinas trabalham em associação ao sistema linfático a fim de drenar os subprodutos do processo inflamatório gerado pela inseminação, também chamado de *clearence* uterino (TROEDSSON, 1999).

Este processo inflamatório deixa de ser fisiológico quando perdura após 48 horas da inseminação, o que leva à maior liberação de prostaglandinas. Com isto pode ocorrer uma luteólise precoce do corpo lúteo (CL), com consequente interrupção da liberação de progesterona e morte embrionária (MAISCHBERGER et al., 2008).

Ademais, as endometrites podem ser classificadas como persistente pós cobertura – quando a inflamação perdura 48 horas pós inseminação –, bacterianas, sexualmente transmissíveis ou fúngicas, e podem ocorrer simultaneamente. Os animais acometidos pela endometrite persistente pós-cobertura estão propensos a desenvolver os outros tipos de endometrites (TROEDSSON, 1999).

A contaminação através da cópula é muito comum em éguas que apresentam algum problema de ordem fisiológica ou anatômica nas barreiras de proteção uterina. Um experimento realizado com garanhões saudáveis diagnosticou a presença de bactérias, fungos filamentosos e leveduriformes na fossa uretral ou prepúcio em 45,4% dos animais. Comparando-se a prevalência de microrganismos na uretra pré ou pós-ejaculação, observou-se que antes da ejaculação 15% dos equinos apresentavam contaminação e após a ejaculação

apenas 6% ainda apresentavam, evidenciando o risco de contaminação vaginal e uterina durante o contato sexual (ROTA et al., 2011).

A colonização uterina por microrganismos pode estar associada a um ou mais problemas nas barreiras de proteção uterina, como: defeitos anatômicos do aparelho reprodutor caudal ou deficiências fisiológicas no mecanismo de imunidade uterina (LEBLANC, 2008b).

Entre as deficiências fisiológicas que podem predispor a endometrite estão relacionadas a baixa imunidade e sistema linfático deficitário. A persistência do relaxamento cervical no período de diestro também é fator predisponente à contaminação (LEBLANC et al., 2010).

Quanto aos fatores hormonais, a suplementação de progesterona, utilizada em alguns manejos reprodutivos, tende a diminuir a contratilidade endometrial, o tônus cervical, além de acarretar a supressão da função dos neutrófilos, aumentando o risco de doenças uterinas (EVANS et al., 1986).

A contaminação iatrogênica também deve ser levada em consideração na incidência de endometrites. A manipulação frequente do trato reprodutivo ou o uso de equipamentos para inseminação artificial, transferência de embrião, uso de espéculo vaginal, aparelho de citologia uterina, entre outros, pode carrear microrganismos para o útero, devendo-se realizar assepsia correta dos materiais e região genital externa antes da manipulação (MCCUE; FERRIS, 2016).

Dentre as endometrites infecciosas, as bactérias são os agentes etiológicos mais frequentes, sendo responsáveis por 60% das endometrites (PASOLINI et al., 2016). Já as endometrites causadas por fungos representam de 1 a 13,5%, com os índices mais altos encontrados em pesquisas realizadas no Brasil (BERNADINO et al., 2007; DASCANIO; LEY; SCHWEIZER, 2000; RIBAS; CARVALHO; STUSSI, 2014). Esses números podem estar relacionados ao fato de as doenças micóticas serem mais comuns em regiões tropicais.

As bactérias mais encontradas em estudos anteriores de isolamento de microrganismos do útero de éguas são *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus*, *Streptococcus B hemolítico*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus* spp. *Staphylococcus aureus*, *Shigella* spp., *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Actinobacillus* spp., e *bacteroides ureolyticus*

(ASSAD et al., 2015; FRONTOSO et al., 2008; LEBLANC; MAGSIG; STROMBERG, 2007; NIELSEN et al., 2010). Existe também a bactéria *Taylorella equigenitalis*, responsável pela Metrite Contagiosa Equina, doença de notificação obrigatória à organização mundial de saúde animal (OIE) (LOBANOV et al, 2018).

Já dentre os fungos mais descritos encontram-se *Candida* spp., *Aspergillus* spp., *Rodothorula* spp., *Mucor* spp., *Cladosporum* spp., sendo *Candida* e *Aspergillus* os gêneros de fungos mais frequentes em endometrites fúngicas. Muitas vezes a infecção por fungos é oportunista, desencadeando-se após tratamento frequente de infusão uterina com antibióticos (DASCANIO; SCHWEIZER; LEY, 2010).

A intensidade da inflamação e apresentação clínica irão depender da capacidade de defesa uterina do animal, dos fatores predisponentes, tempo de infecção e tratamentos anteriores. A endometrite pode ser classificada em clínica, quando há sinais clínicos evidentes ou subclínica quando não há sintomatologia. Também pode ser classificada como aguda, quando apresenta processo inflamatório exacerbado, geralmente apresentando-se clinicamente, ou como crônica, quando apresenta sinais inflamatórios brandos, porém muitas vezes já apresenta áreas de fibrose uterina e comprometimento glandular (LEBLANC; CAUSEY, 2009).

Quando em contato com microrganismos, a defesa celular uterina é iniciada pela imunidade inata composta por barreiras epiteliais, células fagocíticas, células dendríticas, células natural killer e proteínas plasmáticas, incluindo as proteínas do sistema complemento. O mecanismo é ativado por produtos dos microrganismos e células lesionadas, mantendo a mesma forma de resposta independentemente do número de vezes que foi exposta ao microrganismo (ABBAS et al., 2015). A resposta imune inata estimula a resposta imune tardia/adaptativa.

Ao contrário da resposta inata, na resposta imune tardia ocorre um aumento da sua capacidade defensiva a cada nova exposição ao microrganismo agindo sobre um grande número de substâncias microbianas e não microbianas. Esta imunidade possui especificidade, o que faz com que o sistema imune consiga diferenciar substâncias e microrganismos. São componentes da imunidade adaptativa: os linfócitos e produtos secretados por

eles como os anticorpos. Para que as respostas do sistema imune inato e adaptativo sejam reguladas, ocorre a liberação de um grupo de proteínas chamadas citocinas como as interleucinas (IL) e o fator de necrose tumoral (TNF) (ABBAS et al., 2015).

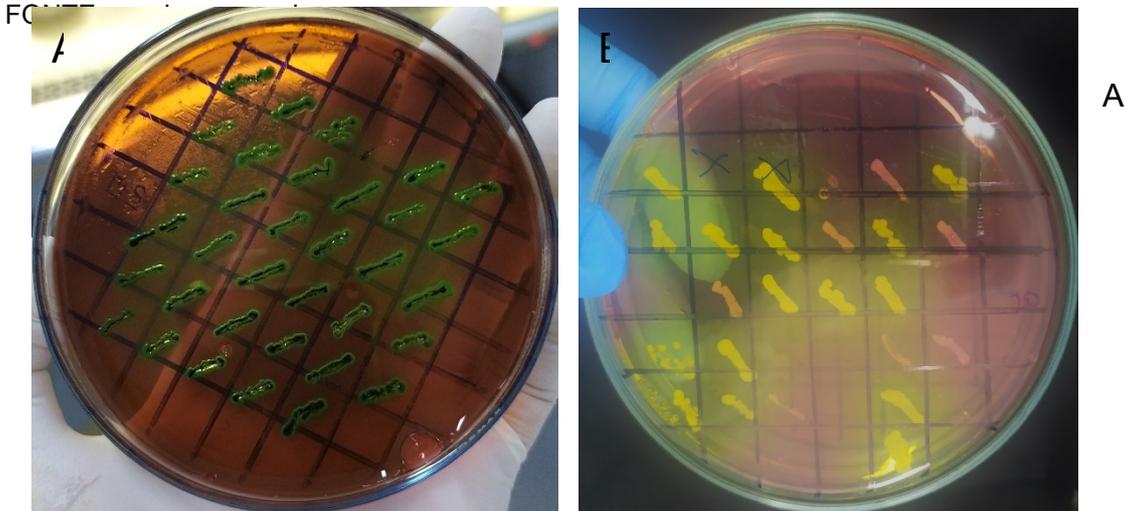
A inflamação aguda se desenvolve rapidamente e pode durar alguns dias, se a infecção não for eliminada nesse período ou o dano tecidual for prolongado, a inflamação passa a ser classificada como crônica, podendo ocorrer remodelamento tecidual, angiogênese e fibrose. (COLLINS et al., 1999).

### 2.1.1 Métodos de diagnóstico

O histórico clínico é o primeiro passo para se chegar ao diagnóstico da endometrite equina. Dessa forma, relatos de infertilidade, corrimento vaginal, aumento de líquido intrauterino, lavado uterino turvo ou com floculações, alterações na conformação vulvo-perineal, presença de pneumovagina ou urovagina, imunossupressão e outras doenças devem ser considerados para a suspeita diagnóstica. Os métodos de diagnóstico mais utilizados são realizados através de ultrassonografia, cultura microbiológica, citologia uterina, biópsia uterina e diagnóstico molecular com sequenciamento de DNA (MCAULIFFE, 2013).

A cultura microbiológica associada ao PCR e sequenciamento de DNA é um método preciso para identificação dos patógenos (NERVO et al., 2019). A coleta de amostras para cultura pode ser realizada diretamente na mucosa uterina com swab acoplado ao mandril do aparelho de citologia uterina. O swab ainda pode ser feito do lavado uterino de baixo volume (LEBLANC; MAGSIG; STROMBERG, 2007). A identificação dos microrganismos cultivados pode ser feita através de testes microbiológicos de catalase, coloração gram, meios seletivos cromogênicos (Figura 1), PCR e sequenciamento de DNA, sendo este último o mais preciso (MARKEY et al., 2013).

Figura 1 – Cultura microbiológica em meio cromatogênico de células endometriais provenientes de úteros de éguas. A– *Escherichia coli* em meio EMB; B- *Staphylococcus* spp. em meio sal manitol.



cultura bacteriológica é considerada padrão ouro para detecção de *T. equigenitalis* pela OIE. No entanto requer um período de incubação superior a 7 dias antes que um resultado conclusivo possa ser obtido. Em contrapartida, a extração bacteriana e o ensaio de PCR em tempo real podem ser concluídos em menos de 6 h (JIMENEZ FILHO et al., 2015; OUSEY et al., 2009).

O PCR e sequenciamento de DNA são técnicas eficazes no diagnóstico de endometrite equina, sobretudo endometrites crônicas de difícil detecção do patógeno por cultura microbiológica. O sequenciamento de DNA permite a diferenciação a nível de espécie e gênero de forma precisa (NERVO et al., 2019).

Já a citologia uterina, possibilita a visualização de células inflamatórias, como neutrófilos e linfócitos, gerando informações sobre o grau da inflamação. Em alguns casos é possível observar traços de fungos na lâmina, porém não permite a identificação de patógenos (COUTO; HUGHES, 1984; ROSZEL; FREEMAN, 1988). A citologia uterina pode ser efetuada através de swab, escova de citologia uterina ou ainda através do lavado uterino de baixo volume. Dentre estes, a escova citológica captura o maior número de células quando realizado o imprinting na lâmina e minimiza resultados falso-negativos (OVERBECK; WITTE; HEUWIESER, 2011; COCCHIA et al., 2012).

Existem diferentes formas de interpretação da lâmina de citologia uterina, podendo ser baseada na proporção encontrada entre células endometriais e neutrófilos, ou na quantidade de neutrófilos por campo, ou ainda na quantidade total de neutrófilos ou células polimorfonucleares de uma amostra inteira (lâmina) (COUTO; HUGHES, 1984). ■

Em uma das formas considera-se citologia positiva para endometrite as lâminas nas quais encontram-se mais que dois neutrófilos por campo em dez campos no aumento de 1000x ao microscópio (RIDDLE; LEBLANC; STROMBERG, 2007). Outra forma considera endometrite positiva quando há mais que 2 neutrófilos por campos e porcentagem maior que 0,5% de neutrófilos em toda a amostra (COCCHIA et al., 2012). Ou ainda quando há mais de 2% de polimorfonucleares em toda a leitura da lâmina de citologia uterina (OVERBECK; WITTE; HEUWIESER, 2011).

Já os linfócitos e os eosinófilos, quando visualizados nas lâminas de citologia estão, associados às infecções crônicas, comum em casos de urovagina e pneumovagina ou refluxo vestibulo-vaginal (RIBAS; CARVALHO; STUSSI, 2014).

Para coleta de material com aparelho de citologia uterina (Figura 2), o swab ou escova citológica deve ser acoplado a extremidade do mandril do aparelho e inserido no lúmen da haste metálica do aparelho para evitar contaminação ao serem introduzidos na vagina, expondo a extremidade da escova citológica ou swab somente após atravessar a cérvix da égua. Dentro do útero deve-se realizar a coleta na parede uterina e para retirada do aparelho, deve-se esconder a escova ou swab novamente no lúmen da haste metálica. (JORGE; ORLANDI; SANTANA, 2017).

Figura 2 – Aparelho coletor para citologia uterina, apresentando haste e mandril metálico interno, compostos por aço inoxidável polido.

FONTE: arquivo pessoal.



Outra forma de coleta para avaliar a presença de endometrite, é através do lavado de baixo volume. Este deve ser realizado em sistema fechado e garante exame global do ambiente uterino e não sendo restrito a apenas um local como quando se realiza a escovação ou swab uterino, além de possibilitar realizar o exame de citologia e cultura através de uma única coleta. Porém, a técnica de lavado uterino demanda maior tempo, pois o material coletado necessita passar por centrifugação antes de ser realizado o *imprinting* na

lâmina de citologia ou inoculação em meio de cultura (LEBLANC; MAGSIG; STROMBERG, 2007; COCCHIA et al., 2012).

Outra técnica utilizada para identificar a presença de endometrite é a biópsia uterina. Este método é um procedimento relativamente invasivo, uma vez que é necessário o uso de pinça especializada, a qual é inserida no lúmen uterino para retirada de uma pequena porção do endométrio para análise histopatológica. Este método mostra a inflamação, a presença de fibroses e também os possíveis danos glândulares causados pela endometrite (BUCZKOWSKA et al., 2014).

Por fim, na rotina clínica, recomenda-se realizar a citologia uterina associada a identificação do patógeno, a fim de se obter um diagnóstico preciso da doença, evidenciando o agente causador e intensidade da inflamação uterina. Dessa forma, possibilitando uma decisão terapêutica mais segura, com utilização de medicamentos adequados, evitando o aumento da resistência de microrganismos aos antibióticos e antifúngicos (RUA et al., 2018).

### **2.1.2 Tratamento**

A escolha da terapêutica utilizada em éguas com endometrite irá depender diretamente da causa e gravidade da enfermidade. Os tratamentos podem incluir correção de defeitos anatômicos de vulva ou períneo, lavagem uterina e/ou infusão intrauterina, que podem ser associados à terapia sistêmica (MCAULIFFE, 2013). A terapia tópica da vagina e fossa clitoriana também devem ser realizadas pois podem atuar como reservatórios de microrganismos (DASCANIO; LEY; SCHWEIZER, 2000).

Quando é identificada a presença de defeitos anatômicos ou lacerações perineais, o tratamento é realizado através de vulvoplastias. Em casos de pneumovagina a técnica cirúrgica mais recomendada é a técnica de Calisck e, em casos mais severos a episioplastia ou ainda a técnica de Pouret. Já nos casos de urovagina, recomenda-se as técnicas de Brown, Shires ou McKinnon (JIMENEZ FILHO et al., 2015).

O tratamento local do útero com lavagens uterinas (Tabela 1) é independente do agente etiológico e é eficaz na remoção mecânica do líquido intrauterino, auxiliando na remoção de microrganismos e biofilmes bacterianos ou fúngicos. Para auxiliar na drenagem do fluido uterino, pode-se estimular a contração uterina utilizando ocitocina via intramuscular ou via endovenosa (FERRIS, 2017).

Tabela 1 – Substâncias e suas respectivas terapêuticas utilizadas nas lavagens uterinas de éguas com endometrite

Substâncias	Terapêutica
N-acetilcisteína (20%)	30mL diluídos em 150mL de solução salina estéril
Dimetilsulfoxido (DMSO) (99%)	50mL em 1 litro de solução salina estéril, após realizar a lavagem com DMSO, fazer outra lavagem com solução salina ou solução de ringer lactato
Peróxido de hidrogênio	60-120mL de infusão, no dia seguinte realizar lavagem com solução salina ou Ringer lactato
Solução de Ringer lactato	1 a 4 litros, repetir a lavagem até que o efluente uterino seja límpido
Solução salina 0.9%	1 a 4 litros, repetir a lavagem até que o efluente uterino seja límpido
Ácido acético (vinagre) 2%	20 a 100mL diluídos em 1 litro de solução salina
Tris-EDTA (Tricide®)	Infusão de 250 a 500mL no útero, seguida de lavagem com solução de Ringer Lactato

FONTE: Adaptado de Ferris (2017).

Algumas das substâncias utilizadas nas lavagens uterinas são: solução de peróxido de hidrogênio N-acetilcisteína, DMSO, Tris-EDTA e ácido acético (vinagre) em combinação com 0,9% solução salina estéril ou Ringer lactato (LIU; TROEDSSON, 2008; FERRIS, 2017) (tabela 1). Durante o tratamento, recomenda-se 4 lavagens por 3 dias consecutivos quando usar apenas solução salina estéril (MATTOS et al., 1997).

O vinagre, apesar de ser muito ácido, não causa alteração significativa do pH intraluminal uterino, mostrando-se seguro para o uso em lavagens uterinas (THOMPSON et al., 2018). Já a iodopolvidona é recomendada por diversos autores, porém, essa substância possui riscos relacionados ao desenvolvimento de fibroses e formação de aderências no endométrio, uma vez que a substância possui ação abrasiva à mucosa uterina (ALVARENGA, 2008).

Outros tratamentos mais recentes incluem a infusão uterina de plasma rico em plaquetas, devido ao seu potencial imunomodulador (CARLUCCIO et al., 2020) e solução fisiológica ozonizada devido ao seu caráter bactericida e fungicida (DE SOUZA; COLARES; DE SOUZA, 2021).

As infusões uterinas com medicamentos (Tabela 2) podem ser efetivas no tratamento da endometrite, porém, é possível ocorrer recidivas quando não acompanhadas de tratamento sistêmico ou quando não realizada a correção de eventual defeito no aparelho reprodutor externo, desequilíbrio hormonal ou de imunidade (MCCUE, 2008).

Tabela 2 – Fármacos que podem ser utilizados na terapia intrauterina de éguas com endometrite

<b>Medicamentos</b>		
<b>Antifúngicos</b>	<b>Antibióticos</b>	<b>Outros</b>
Anfotericina B	Amicacina	Lufenuron
Clotrimazol	Ampicilina	
Fluconazol	Ceftiofur	
Miconazol	Gentamicina	
Nistatina 100.000ui/mL	Penicilina potássica	
	Penicilina procaína	
	Clavulanato de potássio +	
	Ticarcilina	

FONTE: Adaptado de Ferris (2017).

Os medicamentos mais utilizados na terapia sistêmica são ceftiofur, enrofloxacina, fluconazol e itraconazol. O tratamento com enrofloxacina é indicado principalmente para endometrites contendo cepas resistentes de *Pseudomonas* spp (DÍAZ-BERTRANA et al., 2021). Seu uso intrauterino não é recomendado por causar necrose intensa. A anfotericina B é o medicamento mais eficaz contra infecções fúngicas, porém seu uso é evitado devido ao efeito colateral de hepatotoxicidade (COUTINHO DA SILVA; ALVARENGA, 2011; MCCUE; FERRIS, 2016).

Para o tratamento com uso de medicamentos específicos, como antibióticos e antifúngicos, seja para uso local ou sistêmico, é preferível que se realize o diagnóstico e identificação do patógeno, evitando o tratamento equivocado e promoção da resistência frente aos medicamentos. Entretanto, na maioria das vezes os animais são tratados empiricamente (BELTAIRE; CHEONG; COUTINHO DA SILVA, 2012).

### 2.1.3 Resistência à medicamentos antibióticos e antifúngicos

O uso indiscriminado e empírico de medicamentos tem ocasionado em microrganismos cada vez mais resistentes aos medicamentos disponíveis para o tratamento da endometrite em éguas (ASSAD et al., 2015; BELTAIRE; CHEONG; COUTINHO DA SILVA, 2012).

Dessa forma, a fim de se estabelecer padrões de sensibilidade e resistência de bactérias isoladas do útero de éguas, um estudo mostrou que as bactérias *Streptococcus sp.*, *Corynebacterium sp.*, *Escherichia coli* foram sensíveis à gentamicina, ceftriaxona e cefuroxima (100%), seguidos por tetraciclina e cloranfenicol (92,8%), ciprofloxacina e cefalexina (85,7%), ampicilina (71,5%) e penicilina (50%). No mesmo estudo, os patógenos uterinos foram os menos sensíveis à estreptomicina (7,2%), seguido pelo cotrimoxazol (42,8%) e foi verificada a presença de isolados resistentes à estreptomicina (92,8%) seguida por cotrimoxazol (57,2%), penicilina (50%), ampicilina (28,5%), cefalexina (14,3%) e ciprofloxacina (14,3%) (ASSAD et al., 2015).

Já para determinar a eficiência das terapias utilizadas no tratamento da endometrite fúngica, foi realizado o estudo de suscetibilidade *in vitro* aos antifúngicos frequentemente utilizados. Os fungos leveduriformes foram 100% sensíveis a anfotericina B, nistatina e natamicina (compostos polienos), entretanto a sensibilidade foi variável para os compostos azólicos: cetoconazol (90%), fluconazol (61%) e miconazol (48%). Já a sensibilidade dos fungos filamentosos aos compostos polienos variou de 69 a 100%, entretanto, a suscetibilidade aos compostos azólicos foi baixa, apresentando baixa sensibilidade ao itraconazol e 100% de resistência ao fluconazol (BELTAIRE; CHEONG; COUTINHO DA SILVA, 2012).

Os mecanismos de resistência dos microrganismos estão relacionados às mutações gênicas, alteração da composição da membrana celular, ação de enzimas oxidativas, a formação de bombas de efluxo e a capacidade de formar biofilmes (VIEIRA; SANTOS, 2017).

A crescente resistência dos microrganismos frente aos medicamentos disponíveis para o tratamento da endometrite em éguas, tem como solução o investimento em terapias alternativas como o uso do soro ozonizado em infusões uterinas ou então a aposta em medicamentos naturais extraídos de plantas e seus princípios ativos.

## **2.2 Uso terapêutico de fenóis naturais para animais de grande porte**

A necessidade de um medicamento multifacetado, que apresente propriedades antibacterianas, antifúngicas e anti-inflamatórias aponta para produtos naturais como os fenóis, que além destas propriedades, também possuem propriedades antioxidantes (VIGAN, 2010).

A capacidade antibacteriana dos isômeros fenólicos timol e carvacrol, já foi comprovada e discutida em diversos testes de eficácia *in vitro* (REF). Utilizados de forma isolada ou associados a antibióticos convencionais, promovem sinergismo e/ou driblam mecanismos de resistência das bactérias frente aos antibióticos convencionais (KACHUR; SUNTRES, 2019). Essa capacidade sugere vasta aplicabilidade destes compostos na clínica terapêutica de bovinos e equinos.

A eficiência de timol e carvacrol é comprovada contra bactérias gram-negativas e bactérias gram-positivas (KACHUR; SUNTRES, 2019). Estes fenóis apresentam como mecanismos de ação a ruptura da membrana bacteriana (BEN ARFA et al., 2006; GILL; HOLLEY, 2006; LAMBERT et al., 2001; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002; VELDHUIZEN et al., 2006), inibição de bombas de efluxo (MILADI et al., 2016)(CIRINO et al., 2015), inibição das enzimas ATPases presentes na membrana (GILL; HOLLEY, 2006; LIU; AMINI; AHMAD, 2017; ULTEE; BENNIK; MOEZELAAR, 2002), inibição de motilidade bacteriana (BURT et al., 2007; UPADHYAY et al., 2012). Além disso, possuem capacidade de prevenir formação de biofilmes e também promover a ruptura destes quando já instalados (BURT et al., 2014; NOSTRO et al., 2007; TAPIA-RODRIGUEZ et al., 2017).

Estes compostos já foram avaliados para o tratamento de mastite bovina, uma doença comum em vacas leiteiras, e sendo efetivos no combate a

cinco agentes causadores da enfermidade (*Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Streptococcus agalactiae*, *Streptococcus dysgalactiae* e *Streptococcus uberis*) de bactérias causadoras de mastites clínicas em vacas leiteiras. O teste *in vitro* mostrou eficiência e possível aplicabilidade para o uso dos compostos via intramamária (ANANDA BASKARAN et al., 2009).

Já as bactérias *Mannheimia haemolytica* e *Pasteurella multocida* são microrganismos oportunistas e responsáveis por doenças respiratórias em bovinos. O ensaio *in vitro* resultou nos valores de concentração inibitória mínima (CIM) do carvacrol de 2,5 e 1,25 mM, enquanto os valores de CIM do timol foram de 1,25 e 0,625 mM para *P. multocida* e *M. haemolytica*, respectivamente. Quando associados a antibióticos tradicionais, como a doxiciclina, foi observado sinergismo. (KISSELS; WU; SANTOS, 2017).

Além dos componentes majoritários, os óleos essenciais de orégano (72,2% carvacrol) e tomilho (48,8% timol), também apresentam atividade antibacteriana. Esses óleos foram avaliados em cinco bactérias causadoras da endometrite bovina, apresentando resultados semelhantes e em alguns casos superiores ao medicamento tradicional utilizado como controle positivo (PAIANO et al., 2020).

A atividade antimicrobiana de nove óleos essenciais (canela, palmarosa, cravo da Indonésia e Madagascar, niaouli, hortelã, orégano, alecrim e tomilho para molho) contra isolados de *Staphylococcus xylosus* obtidos da mucosa nasal de cavalos também foi avaliada. Os óleos essenciais de tomilho e orégano, que contém altas concentrações de timol e carvacrol, foram efetivos e apresentaram as menores concentrações inibitórias e bactericidas dentre os óleos testados (HUERTA et al., 2016)

O óleo essencial de tomilho também foi efetivo contra *Rodhococcus equi* (SARTORATTO et al., 2004), causador da doença rodococose em equinos caracterizada pela pneumonia grave em potros com menos de seis meses de idade, possui distribuição mundial e é responsável por taxas elevadas de mortalidade e grandes perdas econômicas (PORTO; FERNANDES; BARREIRA, 2011).

A atividade do óleo essencial de orégano foi avaliada contra 23 isolados clínicos. O CIM para *Candida albicans* variou de 125 a 500mL/mL, para

*Sporothrix schenckii*, de 250 a 500mL/mL e para *Aspergillus*, de 30 a 60mL/mL (CLEFF et al., 2010).

Timol e carvacrol em associação a antibacterianos ou antifúngicos foram avaliados contra o oomiceto causador da doença pitiose, muito comum em equinos e de tratamento extremamente difícil. As combinações foram testadas contra 23 isolados de *Pithyium insidiosum* e as principais sinergias observadas foram combinações de carvacrol + itraconazol e timol + itraconazol (96%), timol + claritromicina (92%), carvacrol + claritromicina (88%), timol + minociclina (84%), carvacrol + minociclina (80%), carvacrol + azitromicina (76%), timol + azitromicina (68%), carvacrol + tigeciclina (64%) e timol + tigeciclina (60%), apontando alternativas aos tratamentos existentes (JESUS et al., 2015).

Além das terapias clínicas, o regulamento técnico para especiarias, RDC n. 276 (ANVISA, 2005) permite o uso de tomilho / *Thymus vulgaris* L, orégano chileno / *Origanum vulgare* L., Orégano mexicano / *Lippia graveolens*. Essas especiarias ricas em timol ou carvacrol, além de darem sabor característico ao alimento e possuírem capacidade de inibir o crescimento de bactérias deteriorantes, são considerados seguros para ingestão, sem que causem efeitos tóxicos. (KACHUR; SUNTRES, 2019).

Os ruminantes possuem bactérias em sua flora ruminal que auxiliam a digestão, sendo que estudos foram realizados para avaliar os efeitos de timol e carvacrol sobre essas bactérias, os quais não mostraram alterações significativas em fermentadores que simulavam o ambiente ruminal em curto período de tempo (REF). Este estudo revela que o uso de timol e carvacrol administrado via oral em bovinos, para tratamento de possíveis doenças, não causa alteração na microflora ruminal (BUSQUET et al., 2005; CASTAÑEDA-CORREA et al., 2019).

Já o uso desses ativos em produtos de origem animal como o leite, a carcaça e couro bovino mostraram eficiência na conservação (MCDONNELL et al., 2012; ALVES et al., 2016). A atividade antimicrobiana do carvacrol contra *Escherichia coli* O157 foi avaliada em cortes de couros e carcaças de bovinos. O carvacrol (0, 10, 20 e 30 mg/mL) foi aplicado nos cortes de couro e carcaça bovina, inoculados com *E. coli* O157 e após 10 minutos em contato com o composto, o crescimento bacteriano foi significativamente menor quando comparado ao grupo não tratado com carvacrol (MCDONNELL et al., 2012).

Já na indústria leiteira a atividade antibacteriana da nisina combinada com compostos fenólicos foi confirmada contra bactérias patogênicas, amplamente importantes na ciência de alimentos, com possíveis aplicações para a preservação do leite (ALVES et al., 2016).

Poucos estudos avaliaram o efeito do timol ou carvacrol *in vivo*, um dos estudos mostrou o efeito positivo no tratamento pulmonar de equinos, devido ao potencial vasodilatador e anti-inflamatório desses compostos fenólicos (VAN DEN HOVEN et al., 2003). No entanto, a maioria dos estudos em bovinos ou equinos ainda está na fase de testes *in vitro*, mas apontam para aplicação promissora destes compostos na terapêutica veterinária.

### 3. REFERÊNCIAS

ALVARENGA, M. A. Diagnóstico e tratamento de Endometrite Fúngica em Éguas. **Ix Conferência Anual Da Abraveq**, 2008.

ALVES, F. C. B. et al. Short communication: Inhibitory activities of the lantibiotic nisin combined with phenolic compounds against *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes* in cow milk. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 3, p. 1831–1836, 2016. DOI: 10.3168/jds.2015-10025.

ANANDA BASKARAN, S. et al. Antibacterial effect of plant-derived antimicrobials on major bacterial mastitis pathogens *in vitro*. **Journal of Dairy Science**, v. 92, n. 4, p. 1423–1429, 2009. DOI: 10.3168/jds.2008-1384.

ANVISA. Resolução RDC nº276, de 22 de setembro de 2005. **Diário Oficial da União**, p. 7, 2005.

ASSAD, N. I. et al. Isolation and antibiotic sensitivity of uterine microbial pathogens - a study of 30 endometritis affected mares. **Intas Polivet**, v. 16, n. 2, p. 223–230, 2015. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1990.tb06802.x

BELTAIRE, K. A.; CHEONG, S. H.; COUTINHO DA SILVA, M. A. Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999-2011). **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 43, p. 84–87, 2012. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2012.00608.x.

BEN ARFA, A. et al. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v. 43, n. 2, p. 149–154, 1 ago. 2006. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2006.01938.x.

BENKO, T. et al. Incidence of bacterial pathogens in equine uterine swabs, their antibiotic resistance patterns, and selected reproductive indices in English thoroughbred mares during the foal heat cycle. **Veterinarni Medicina**, v. 60, n. 11, p. 613–620, 2015. DOI: 10.17221/8529-VETMED.

BERNADINO, M. DE L. A. et al. Endometrite equina. Fungos e Bactérias. **Archivos de Zootecnia**, v. 56, p. 875–884, 2007. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2012.00608.x.

BUCZKOWSKA, J. et al. Comparison of the biopsy and cytobrush techniques for diagnosis of subclinical endometritis in mares. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 12, n. 1, p. 1–6, 2014. DOI: 10.1186/1477-7827-12-27.

BURT, S. A. et al. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, n. 14, p. 4484–4490, 15 jul. 2007.

BURT, S. A. et al. The Natural Antimicrobial Carvacrol Inhibits Quorum Sensing in *Chromobacterium violaceum* and Reduces Bacterial Biofilm Formation at Sub-Lethal Concentrations. **PLoS ONE**, v. 9, n. 4, p. e93414, 1 abr. 2014. DOI: 10.1186/1477-7827-12-27. DOI: 10.1128/AEM.00340-07

BUSQUET, M. et al. Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. **Animal Feed Science and Technology**, v. 123-124 PA, p. 597–613, 2005. DOI: 10.1016/j.anifeedsci.2005.03.008.

CARLUCCIO, A. et al. Platelet-rich plasma uterine infusion and pregnancy rate in barren mares with chronic degenerative endometritis. **Polish Journal of Veterinary Sciences**, v. 23, n. 3, p. 431–438, 2020. DOI: 10.24425/pjvs.2020.134688.

CASTAÑEDA-CORREA, A. et al. Effects of thymol and carvacrol, alone or in combination, on fermentation and microbial diversity during *in vitro* culture of bovine rumen microbes. **Journal of Environmental Science and Health - Part B Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes**, v. 54, n. 3, p.

170–175, 2019. DOI: 10.1080/03601234.2018.1536580.

CAUSEY, R. C. Making sense of equine uterine infections: The many faces of physical clearance. **The Veterinary Journal**, v. 172, n. 3, p. 405–421, 1 nov. 2006. DOI: 10.1016/J.TVJL.2005.08.005.

CIRINO, I. C. S. et al. The Essential Oil from *Origanum vulgare* L. and Its Individual Constituents Carvacrol and Thymol Enhance the Effect of Tetracycline against *Staphylococcus aureus*. **Chemotherapy**, v. 60, n. 5–6, p. 290–293, 2015. DOI: 10.1159/000381175.

CLEFF, M. B. et al. Atividade inibitória do óleo essencial de orégano em fungos de importância médica e veterinária. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 62, n. 5, p. 1291–1294, 2010. DOI: 10.1590/S0102-09352010000500040.

COCCHIA, N. et al. Comparison of the cytobrush, cottonswab, and low-volume uterine flush techniques to evaluate endometrial cytology for diagnosing endometritis in chronically infertile mares. **Theriogenology**, v. 77, n. 1, p. 89–98, 2012. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2011.07.020.

COUTINHO DA SILVA, M. A.; ALVARENGA, M. A. Fungal endometritis. In: MCKINNON, A. O. et al. (Eds.). **Equine reproduction**. Blackwell Publishing Ltd, 2011. p. 2643–2651.

COUTO, M. A.; HUGHES, J. P. Technique and interpretation of cervical and endometrial cytology in the mare. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 4, n. 6, p. 265–273, 1984. DOI: [https://doi.org/10.1016/S0737-0806\(84\)80064-7](https://doi.org/10.1016/S0737-0806(84)80064-7)

DASCANIO, J. J.; SCHWEIZER, C.; LEY, W. B. Equine fungal endometritis. **Equine Veterinary Education**, v. 13, n. 6, p. 324–329, 5 jan. 2010. DOI: 10.1111/j.2042-3292.2001.tb00122.x.

DASCANIO, J.; LEY, W.; SCHWEIZER, C. How to diagnose and treat fungal endometritis. **AAEP Proceedings**, v. 46, p. 316–318, 2000.

DE SOUZA, A. K. L.; COLARES, R. R.; DE SOUZA, A. C. L. The main uses of ozone therapy in diseases of large animals: A review. **Research in Veterinary Science**, v. 136, p. 54–56, 2021. DOI: 10.1016/j.rvsc.2021.01.018

DÍAZ-BERTRANA, M. L. et al. Microbial Prevalence and Antimicrobial Sensitivity in Equine Endometritis in Field Conditions. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1476, 2021. DOI: 10.3390/ANI11051476.

EBANI, V. V. et al. *In vitro* antimicrobial activity of selected essential oils against bacteria and yeasts isolated from the genital tract of mares. **Natural Product Research**, v. 5, p. 1–5, 2021. DOI: 10.1080/14786419.2021.1915307.

EVANS, M. J. et al. Clearance of bacteria and non-antigenic markers following intra-uterine inoculation into maiden mares: Effect of steroid hormone environment. v. 26, n. 1, p. 37–50, 1986. DOI: 10.1016/0093-691x(86)90110-x

FERRIS, R. A. Therapeutics for Infectious Endometritis: A Clinical Perspective. **Revista Brasileira de Reprodução Animal**, v. 41, n. 1, p. 175–179, 2017.

FRAGA, M. et al. Vaginal lactic acid bacteria in the mare: Evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains, **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 93, n. 1–2, p. 71–78, 2008. DOI: 10.3855/jidc.12076.

FRONTOSO, R. et al. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 1, p. 1–6, 2008. DOI: 10.1016/j.rvsc.2007.02.008.

GHOLAMI-AHANGARAN, M.; AHMADI-DASTGERDI, A.; KARIMI-DEHKORDI, M. Thymol and carvacrol; as antibiotic alternative in green healthy poultry production. **Plant Biotechnology Persa**, v. 2, n. 1, p. 22–25, 1 jun. 2020. DOI: 10.29252/pbp.2.1.22.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Lactobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 108, n. 1, p. 1–9, 15 abr. 2006. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.009.

HUERTA, B. et al. Essential Oils in the Control of Infections by *Staphylococcus xylosus* in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 38, p. 19–23, 2016. DOI: 10.1016/j.jevs.2015.11.011.

JESUS, F. P. K. et al. *In vitro* activity of carvacrol and thymol combined with antifungals or antibacterials against *Pythium insidiosum*. **Journal de Mycologie Medicale**, v. 25, n. 2, p. e89–e93, 2015. DOI: 10.1016/j.mycmed.2014.10.023.

JIMENEZ FILHO, D. L. et al. Pneumovagina and Urovagina in Mares – Literature Review. **Nucleus Animalium**, v. 7, n. 1, p. 71–80, 2015. DOI: 10.3738/1982.2278.1068.

JORGE, M. L. N.; ORLANDI, C. M. B.; SANTANA, A. E. Citocentrifugação e métodos convencionais na citologia uterina de éguas em estro e diestro. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 69, n. 4, p. 802–806, 2017.

KACHUR, K.; SUNTRES, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1080/10408398.2019.1675585.

KISSELS, W.; WU, X.; SANTOS, R. R. Short communication: Interaction of the isomers carvacrol and thymol with the antibiotics doxycycline and tilmicosin: *In vitro* effects against pathogenic bacteria commonly found in the respiratory tract of calves. **Journal of Dairy Science**, v. 100, n. 2, p. 970–974, 2017. DOI: 10.3168/jds.2016-11536

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of**

**Applied Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 453–462, 12 set. 2001. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2001.01428.x

LEBLANC, M.; CAUSEY, R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 3, p. 10–22, 2009. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01485.x.

LEBLANC, M. M. When to refer an infertile mare to a theriogenologist. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 421–429, 2008a. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.04.021.

LEBLANC, M. M. The Chronically Infertile Mare. **AAEP Proceedings**, v. 54, p. 391–407, 2008b.

LEBLANC, M. M. et al. Scintigraphic measurement of uterine clearance in normal mares and mares with recurrent endometritis. **Equine Veterinary Journal**, v. 26, n. 2, p. 109–113, 2010. DOI: 10.1111/j.2042-3306.1994.tb04346.x.

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, n. 3, p. 403–412, 2007. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.04.038.

LIU, I. K. M.; TROEDSSON, M. H. T. The diagnosis and treatment of endometritis in the mare: Yesterday and today. **Theriogenology**, v. 70, n. 3, p. 415–420, 2008. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2008.05.040.

LIU, M.; AMINI, A.; AHMAD, Z. Safranin and its analogs inhibit *Escherichia coli* ATP synthase and cell growth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 95, p. 145–152, 1 fev. 2017. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2016.11.038.

LOBANOV, V. A. et al. Development and validation of a duplex real-time PCR assay for the diagnosis of equine piroplasmiasis. **Parasites and Vectors**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2018. DOI: 10.1186/s13071-018-2751-6.

MAISCHBERGER, E. et al. Equine post-breeding endometritis: A review. **Irish Veterinary Journal**, v. 61, n. 3, p. 199–204, 2008. DOI: 10.1186/2046-0481-61-3-163

MAPA, M. DA A. E A. Estudo do complexo do Agronegócio do cavalo. p. 1–45, 2016.

MARKEY, B. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. 2. ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2013.

MATTOS, R. et al. Uterine lavage with saline in mares as treatment for endometritis. **Pferdeheilkunde Equine Medicine**, v. 13, n. 5, p. 521–524, 1997. DOI: 10.21836/pem19970516.

MCAULIFFE, S. Reproductive disorders In: **Knottenbelt and Pascoe's Color**

**Atlas of Diseases and Disorders of the Horse**, p. 443–513, 2013.

MCCUE, P. M. The Problem Mare: Management Philosophy, Diagnostic Procedures, and Therapeutic Options. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 28, n. 11, p. 619–626, 2008. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jevs.2008.10.009>.

MCCUE, P. M.; FERRIS, R. A. **Formulary and protocols in equine reproduction**. 1. ed. Colorado: COLORADO STATE UNIVERSITY, 2016.

MCDONNELL, M. J. et al. Evaluation of carvacrol for the control of *escherichia coli* O157 on cattle hide and carcass cuts. **Foodborne Pathogens and Disease**, v. 9, n. 11, p. 1049–1052, 2012. DOI: 10.1089/fpd.2012.1224.

MILADI, H. et al. Antibacterial and efflux pump inhibitors of thymol and carvacrol against food-borne pathogens. **Microbial Pathogenesis**, v. 99, p. 95–100, 1 out. 2016. DOI: 10.1016/j.micpath.2016.08.008.

NAGHDI BADI, H. et al. An Overview on Two Valuable Natural and Bioactive Compounds, Thymol and Carvacrol, **Journal of Medicinal Plants**, v. 87, p 13–15, 2017. DOI: 20.1001.1.2717204.2017.16.63.3.8.

NERVO, T. et al. Chronic Endometritis in Subfertile Mares With Presence of Chlamydial DNA. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 73, p. 91–94, 1 fev. 2019. DOI: 10.1016/j.jevs.2018.12.003.

NEWCOMBE, J. R. Why Are Mares with Pneumovagina Susceptible to Bacterial Endometritis? A Personal Opinion. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 31, n. 4, p. 174–179, 2011. DOI: 10.1016/J.JEVS.2011.02.008

NIELSEN, J. M. et al. Diagnosis of Endometritis in the Mare Based on Bacteriological and Cytological Examinations of the Endometrium: Comparison of Results Obtained by Swabs and Biopsies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 1, p. 27–30, 2010. DOI: 10.1016/j.jevs.2009.11.006.

NOSTRO, A. et al. Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 519–523, 1 abr. 2007. DOI: 10.1099/jmm.0.46804-0.

OUSEY, J. C. et al. An investigation into the suitability of a commercial real-time PCR assay to screen for *Taylorella equigenitalis* in routine prebreeding equine genital swabs. **Equine Veterinary Journal**, v. 41, n. 9, p. 878–882, 2009. DOI: 10.2746/042516409X474275.

OVERBECK, W.; WITTE, T. S.; HEUWIESER, W. Comparison of three diagnostic methods to identify subclinical endometritis in mares. **Theriogenology**, v. 75, n. 7, p. 1311–1318, 2011. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2010.12.002

PAIANO, R. B. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils against pathogens often related to cattle endometritis. **Journal of Infection**

in **Developing Countries**, v. 14, n. 2, p. 177–183, 2020. DOI: 10.3855/jidc.12076.

PASOLINI, M. P. et al. Endometritis and Infertility in the Mare – The Challenge in Equine Breeding Industry—A Review. **Genital Infections and Infertility**, v. 1, p. 285–328, 2016. DOI: 10.5772/62461.

PORTO, A. C. R. C.; FERNANDES, W. R.; BARREIRA, M. C. R. *Rhodococcus equi* - epidemiology, clinical manifestations, diagnosis and treatment. **Ciência Rural**, v. 41, n. 12, p. 2143–2150, 2011. DOI: 10.1590/S0103-84782011001200017

RIBAS, J. A.; CARVALHO, E. Q.; STUSSI, J. P. Endometrite fúngica em éguas: diagnóstico e implicações clínico-patológicas. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 204–212, 2014. DOI: 10.4322/rbcv.2014.386

RIDDLE, W. T.; LEBLANC, M. M.; STROMBERG, A. J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 395–402, 2007. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.05.050.

RODRIGUES, P.; COSTA, R.; KISS, C. Farmacêutica Brasileira Nos Limites Da Subordinação Econômica. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, v. 28, n. 1, p. 1–22, 2018. DOI: 10.1590/s0103-73312018280104

ROSZEL, J. F.; FREEMAN, K. P. Equine endometrial cytology. **The Veterinary clinics of North America. Equine practice**, v. 4, n. 2, p. 247–262, 1988. DOI: 10.1016/S0749-0739(17)30640-5.

ROTA, A. et al. Presence and distribution of fungi and bacteria in the reproductive tract of healthy stallions. **Theriogenology**, v. 76, n. 3, p. 464–470, 2011. DOI: 10.1016/J.JEVS.2011.02.008.

RUA, M. A. S. et al. Diagnostic methods to detect uterus illnesses in mares. **Theriogenology**, v. 114, p. 285–292, 2018. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.03.042

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 4, p. 275–280, 2004. DOI: 10.1590/S1517-83822004000300001.

SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H. *In vitro* synergy of eugenol on the antifungal effects of voriconazole against *Candida tropicalis* and *Candida krusei* strains isolated from the genital tract of mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 53, n. 1, p. 94–101, 2021. DOI: 10.1111/evj.13268

TAPIA-RODRIGUEZ, M. R. et al. Carvacrol as potential quorum sensing inhibitor of *Pseudomonas aeruginosa* and biofilm production on stainless steel surfaces. **Food Control**, v. 75, p. 255–261, 1 maio 2017. DOI: 10.1016/j.foodcont.2016.12.014.

THOMPSON, R. L. et al. Assessment of uterine luminal pH in mares and the

effect of dilute vinegar lavage on uterine luminal pH and endometrial health. **Theriogenology**, v. 117, p. 7–15, 2018. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.05.014.

TROEDSSON, M. H. T. Uterine clearance and resistance to persistent endometritis in the mare. **Theriogenology**, v. 52, p. 461–471, 1999. DOI: 10.1016/S0093-691X(99)00143-0 .

ULTEE, A.; BENNIK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, n. 4, p. 1561–1568, 1 abr. 2002. DOI: 10.1128/AEM.68.4.1561-1568.2002.

UPADHYAY, A. et al. Plant-derived antimicrobials reduce *Listeria monocytogenes* virulence factors *in vitro*, and down-regulate expression of virulence genes. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 1, p. 88–94, 15 jun. 2012. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.018.

VAN DEN HOVEN, R. et al. Study of the effect of Bronchipret on the lung function of five Austrian saddle horses suffering recurrent airway obstruction (heaves). **Veterinary Record**, v. 152, n. 18, p. 555–557, 2003. DOI: 10.1136/vr.152.18.555.

VELDHUIZEN, E. J. A. et al. Structural requirements for the antimicrobial activity of carvacrol. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 5, p. 1874–1879, 8 mar. 2006. DOI: 10.1021/jf052564y.

VIEIRA, A. J. H.; SANTOS, J. I. DOS. Mecanismos de resistência de *Candida albicans* aos antifúngicos anfotericina B, fluconazol e caspofungina. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v. 49, n. 3, p. 235–239, 2017. DOI: 10.1016/j.foreco.2013.10.045.

Vieira, E. R. Aspectos econômicos e sociais do complexo agronegócio cavalo no estado de Minas Gerais. Orientador: Adalgiza Souza Carneiro de Rezende. 2011. Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em zootecnia, Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2011.

VIGAN, M. Essential oils: Renewal of interest and toxicity. **European Journal of Dermatology**, v. 20, n. 6, p. 685–692, 2010. DOI: 10.1684/ejd.2010.1066.

## CAPÍTULO 1

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FENÓIS NATURAIS CONTRA  
MICROORGANISMOS ISOLADOS DO TRATO GENITAL DE ÉGUAS**

***ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF NATURAL PHENOLS AGAINST  
MICROORGANISMS ISOLATED FROM THE GENITAL TREAT OF MARES***

Artigo a ser submetido à publicação ao periódico: Equine Veterinary Journal -

Article type: General Article

---

Parte da dissertação de mestrado em Ciências Veterinárias da Universidade Federal do Espírito Santo – UFES, do primeiro autor.

Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias, Centro de Ciências Agrárias e de Engenharia – CCAE, Universidade Federal do Espírito Santo - UFES, Alto Universitário, s/n. Centro, Alegre-ES. CEP: 29500-00, Caixa Postal 16. Email: priscilalorenzoni@gmail.com

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE FENÓIS NATURAIS CONTRA  
MICROORGANISMOS ISOLADOS DO TRATO GENITAL DE ÉGUAS**

**RESUMO**

## Contextualização

A endometrite é uma das principais causas de infertilidade em éguas, gerando perdas econômicas no setor de reprodução equina. A dificuldade no tratamento dessa enfermidade está relacionada ao surgimento de cepas resistentes e à gama limitada de medicamentos disponíveis para uso específico no trato genital de éguas. A necessidade de um medicamento multifacetado, que apresente propriedades antifúngicas e antibacterianas, aponta para o uso de produtos naturais, dessa forma, o estudo se concentra nessas propriedades biológicas dos isômeros timol e carvacrol.

## Objetivos

Analisar a atividade antimicrobiana de timol ou carvacrol sobre microrganismos causadores de endometrite

## Design de estudo

Experimento *in vitro*.

## Métodos

Amostras uterinas de éguas receptoras de embrião (n=38) com histórico de infertilidade foram coletadas para cultura microbiológica e citologia endometrial. Os microrganismos isolados foram identificados por sequenciamento de DNA. A sensibilidade dos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus sciuri* e *Rhodulotora glutinis* aos fenóis timol ou carvacrol foi avaliada por ensaios de microdiluição em caldo.

## Resultados

55,26% (n=21) dos animais tiveram amostras com crescimento microbiológico. O sequenciamento de DNA identificou 12 espécies distintas, sendo 80% bactérias e 20% fungos ou leveduras. O microrganismo mais frequente foi *E. coli* (50%), e o estudo da filogenia das cepas deste microrganismo sugere que a alta incidência dele como agente causador da endometrite não é devido a fatores ambientais. Os valores de IC<sub>50</sub> para timol / carvacrol foram, respectivamente, 0,101 / 0,076 mg/mL para *E. coli*, 0,192 / 0,197 mg/mL para *S. Sciuri* e 0,0378 / 0,0331 mg/mL para *R. glutinis*.

## Principais Limitações

A suscetibilidade *in vitro* não prediz com certeza o sucesso clínico de um tratamento *in vivo*.

## Conclusão

Timol e carvacrol apresentaram efeito bactericida contra *E. coli*, *S. sciuri* e fungicida contra *R. glutinis* isolados do útero de éguas com endometrite. Essas propriedades evidenciadas neste estudo, somando-se com outras propriedades biológicas já conhecidas destes fenóis podem estabelecer a base para uma alternativa de abordagem terapêutica contra isolados uterinos resistentes a outras drogas ou formulações disponíveis para o tratamento da endometrite equina.

## 1. INTRODUÇÃO

Estudos apontam que 46% da renda dos criadores de equinos provém da reprodução e dentro desse valor, 50% provém da inseminação artificial e 33,3% da transferência de embriões (MARTINSON et al., 2006; VIERIA, 2011) Dessa forma, torna-se fundamental a manutenção da saúde reprodutiva desses animais. Entretanto, estudos mostram que a endometrite tem alcançado altos índices, sendo a causa mais comum de infertilidade e subfertilidade em éguas\_ (REF), o que gera grandes perdas econômicas no setor da reprodução equina, além dos danos ao bem estar animal. Dentre os tipos de endometrite, é notável a dificuldade de tratamento das endometrites causadas por bactérias, leveduras ou fungos filamentosos, devido ao crescente número de cepas de microrganismos resistentes aos medicamentos disponíveis na rotina clínica destes animais (ASSAD et al., 2015; BELTAIRE; CHEONG; COUTINHO DA SILVA, 2012; DÍAZ-BERTRANA et al., 2021; FRONTOSO et al., 2008; WOLNY-KOŁADKA, 2018).

Neste contexto, os estudos de novos medicamentos relacionados ao uso de produtos naturais têm obtido resultados promissores para o tratamento de diversas doenças em equinos, incluindo a endometrite\_ (REF). Além dos óleos essenciais de plantas, os ativos isolados como os fenóis naturais são uma

opção para o tratamento de infecções reprodutivas nas éguas. Estes compostos apresentam grande potencial bactericida e fungicida, além de sinergia com medicamentos já utilizados na rotina de tratamento dessa enfermidade (EBANI et al., 2021; HUERTA et al., 2016).

Utilizados de forma isolada ou associados a antibióticos convencionais, os ativos fenólicos naturais promovem sinergismo e/ou driblam mecanismos de resistência das bactérias frente aos antibióticos convencionais utilizados no tratamento da endometrite equina (EBANI et al., 2021; SHARIFZADEH; SHOKRI, 2021). Os compostos timol e carvacrol são fenóis naturais e a capacidade antibacteriana e antifúngica destes isômeros já foi comprovada e discutida em diversos testes de eficácia *in vitro* e *in vivo* para outras doenças (KACHUR; SUNTRES, 2019), porém ainda não foram descritos como adjuvantes no tratamento da endometrite equina.

Essas propriedades biológicas de timol e carvacrol sugerem que são ativos naturais de uso potencial no tratamento da endometrite equina. Neste âmbito, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana dos fenóis naturais contra microrganismos causadores de endometrite isolados do útero de éguas com histórico de infertilidade.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Seleção das éguas do estudo

O estudo incluiu 38 éguas receptoras de embrião (raças variadas) ~~com histórico de infertilidade~~. Os animais pertenciam a um mesmo haras (21° 12' 23"S, 41° 53' 23"O). A idade média das éguas era de 6,2 anos (intervalo de 5 a 16 anos). Os animais conviviam em mesmo ambiente e pastavam em piquetes de *Brachiaria decubens*, com livre acesso a água e sal mineral. A temperatura média era de 30 °C em setembro de 2020.

Para este estudo foram utilizadas apenas éguas que não receberam tratamento com antibióticos e anti-inflamatórios sistêmicos ou intrauterinos nos últimos 60 dias anteriores ao experimento e apresentavam histórico de infertilidade. No momento da coleta de amostras, os animais estavam em fase

estrogênica, não apresentaram doença clínica evidente na anamnese e não se encontravam prenhes.

## 2.2 Coleta de amostras uterinas para análises

Após a anamnese e seleção do grupo de estudo, a área vulvar de cada égua foi limpa com água, iodopolvidona degermante 10% e seca. A cauda foi envolvida com bandagem de atadura médica. Após a limpeza e esterilização em fogo, um coletor citológico de aço cirúrgico foi utilizado para coletar material do endométrio uterino para as análises (MCCUE; FERRIS, 2016).

A coleta das amostras biológicas foram realizadas nas éguas em fase estrogênica, devido ao relaxamento da cérvix. Para a coleta de amostras da mucosa uterina a escova citológica ou swab foram acoplados a extremidade do mandril e inserido no lúmen da haste metálica do aparelho para evitar contaminação ao serem introduzidos na vagina, expondo a extremidade da escova citológica ou swab somente após atravessar a cérvix da égua. Para retirada do aparelho, foi inserido a escova ou swab novamente no lúmen da haste metálica. Primeiro foi realizada a coleta de material para cultura microbiológica da mucosa uterina utilizando swab acoplado ao aparelho. O swab de ponta Rayon era mantido em contato com a mucosa uterina por 60 segundos após ser retirado do trato reprodutivo da égua, o swab era imediatamente inserido em tubo com meio semissólido Stuart estéril (LEBLANC; MCKINNON, 2011). Em seguida, após nova esterilização do aparelho, era acoplada uma escova ginecológica para coleta de material para citologia uterina. De contato com o endométrio uterino girou-se a escova citológica três vezes para direita e três vezes para a esquerda. Após a retirada do aparelho, foi realizado o *imprinting* em lâmina de microscopia (RUA et al., 2018). Este procedimento foi realizado em cada animal do experimento.

## 2.3 Avaliação citológica e microbiológica

As lâminas de citologia uterina foram fixadas em lugol e coradas em corante panóptico rápido e a leitura das lâminas foi realizada em microscópio no aumento de 1000x. Considerou-se citologia positiva para endometrite as

lâminas nas quais encontravam-se mais que dois neutrófilos por campo em dez campos (RIDDLE; LEBLANC; STROMBERG, 2007).

As culturas microbiológicas foram realizadas no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Viçosa. Inicialmente, as amostras de todas as éguas foram inoculadas individualmente em três meios distintos não seletivos: ágar Luria Bertani (LB) - para crescimento de bactérias (37 °C/ 24h); ágar YPD – para o crescimento de leveduras (32 °C/ 48h) e ágar BDA – para o crescimento de fungos filamentosos (27 °C/ 7 dias). As colônias de bactérias que cresciam em meio LB, foram novamente inoculadas em dois meios seletivos: ágar sal manitol e ágar EMB (37 °C/24h) para melhor isolamento das colônias (MARKEY et al., 2013).

O diagnóstico para endometrite foi considerado positivo quando as amostras apresentavam crescimento microbiológico mesmo que a citologia uterina do mesmo animal não indicasse processo inflamatório (RIDDLE; LEBLANC; STROMBERG, 2007).

#### **2.4 Identificação dos microrganismos**

Cada colônia isolada passou pelo processo de extração de DNA (QUINN, P. J., MARKEY, B. K., LEONARD, F. C., HARTIGAN, P., FANNING, S., & FITZPATRICK, 2011). O DNA extraído e de boa qualidade foi amplificado por reação em cadeia da polimerase (PCR). Para as bactérias foi utilizado primer 16S e para fungos e leveduras os primers ITS1 e 1TS4. Todas as amostras de DNA extraídas foram quantificadas em nanodrop (SpectraMax M5) e a concentração de 50ng/mL de DNA foi utilizada na reação de PCR (2720 Thermal Cycler, Applied Biosystems), dessa forma foi utilizado volume final de reação de PCR de 50 µL.

O produto da PCR de cada isolado foi seco em sistema à vácuo e os *pallets* formados foram enviados ao laboratório Gogenetic (Londrina- Paraná) para realização do sequenciamento de DNA. O banco de dados Genbank do NCBI foi utilizado para identificar as sequências de nucleotídeos obtidas com o produto da PCR. Neste banco de dados foram considerados Identidade de cobertura e *query over* superiores a 98% e o *e-value* que apresentou maior

número de alinhamentos para a espécie e/ou variável da espécie foi o fator determinante.

## 2.5 Análise filogenética

Com o objetivo de avaliar a diversidade e história evolutiva de isolados da espécie causadora de endometrite mais frequente neste estudo, arquivos multi-fasta foram utilizados para a análise de filogenia por meio do software MEGA7 (versão 7.0.26) (Kumar et al., 2016). As sequências foram alinhadas utilizando o ClustalW com parâmetros padrões. A árvore filogenética foi obtida utilizando o método *maximum likelihood* com os seguintes parâmetros: deleção completa dos *gaps*, modelo Tamura –Nei (Tamura et al., 2007) e 1000 réplicas de *bootstrap*. Os modelos gerados foram considerados de qualidade para valores de *bootstrap* acima de 50%.

## 2.6 Compostos fenólicos

Foram utilizados os isômeros fenólicos puros Timol (98,5% Sigma-Aldrich, PubChem SID 57654643) e carvacrol (98,5% Sigma-Aldrich, PuChem SID 24857025), para ....??? denominados de acordo com a IUPAC como 5-metil-2-(1-metiletil) fenol e 5-Isopropil-2-metilfenol; 2-Metil-5-(1-metiletil) fenol, respectivamente.

## 2.7 Preparo dos inóculos

Para a preparação dos inóculos, 0,5 mL de cada isolado de *Escherichia coli*, *Staphylococcus sciuri* ou *Rhodulotora glutinis* foram adicionados a 75 mL de um meio de culturas líquidos apropriados para cada microorganismo, ou seja, LB para as bactérias e YPD para a levedura. Os tubos com os inóculos foram cultivados em um agitador durante 18 horas a 35 °C. Ao final do cultivo, a abrorbânciaabsorbância de cada inóculo foi analisada em espectrofotômetro utilizando um comprimento de onda de 625nm para verificar que sua turbidez coincidia com a da solução padrão de McFarland 0,5, conforme delineado pela NCCLS/CLSI, o que equivale a absorbância entre 0,08 e 0,10nm.

## 2.8 Teste de microdiluição em caldo

O teste de microdiluição em caldo foi realizado seguindo a metodologia criada para produtos naturais, desenvolvida por Zgoda & Porter (2008) e possui objetivo de ???. Os compostos fenólicos foram diluídos previamente em microtubos com 95µL de água estéril e 5µL de DMSO (PA 99,9% Vetec Quimica fina LTDA) a 2,5% resultando em uma concentração de 10mg/mL. As placas de 96 poços foram preparadas dispensando em cada poço 100µL de meio apropriado e 50µL do inóculo. A fim de determinar os valores IC<sub>50</sub>, oito diluições em série foram realizadas em duplicata. Dessa forma, no primeiro poço foram dispensados 50 µL da diluição do composto fenólico e com auxílio de micropipeta a diluição seriada foi realizada, os últimos 50 µL foram descartados. O volume final de cada poço foi de 150 µL. As concentrações dos compostos nos poços variaram de 5mg/mL a 0.0391mg/mL. Poços com os compostos fenólicos puros em diluição seriada na mesma concentração foram utilizados como branco. O controle não tratado foi realizado para cada microrganismo.

O conteúdo de cada poço foi completamente misturado com um pipetador multicanal, e as microplacas foram incubadas em temperaturas e por períodos de tempo apropriados para o organismo em estudo: 24 horas a 35° C no caso das bactérias *E. coli* e *S. sciuri* e por 48 horas a 35° C no caso da levedura *R. glutinis*. O crescimento dos microrganismos foi determinado pela absorbância a 750 nm em um leitor de microplacas automatizado (SpectraMax M5 Spectrofotometer). Antes de fazer as leituras no espectrofotômetro, o conteúdo de todos os poços foi completamente misturado com um pipetador multicanal para ressuspender as células aglomeradas no fundo dos poços.

## 2.9 Determinação do IC<sub>50</sub>

As concentrações inibitórias de 50% (IC<sub>50</sub>) contra *E. coli*, *S. sciuri* e *R. glutinis* foram determinadas para timol e carvacrol. O ajuste dos dados foi realizado por método de regressão não linear usando o log da concentração versus a porcentagem de viabilidade dos microrganismos. Os IC<sub>50</sub> calculados

foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ ) usando GraphPad Prism (versão 9.03).

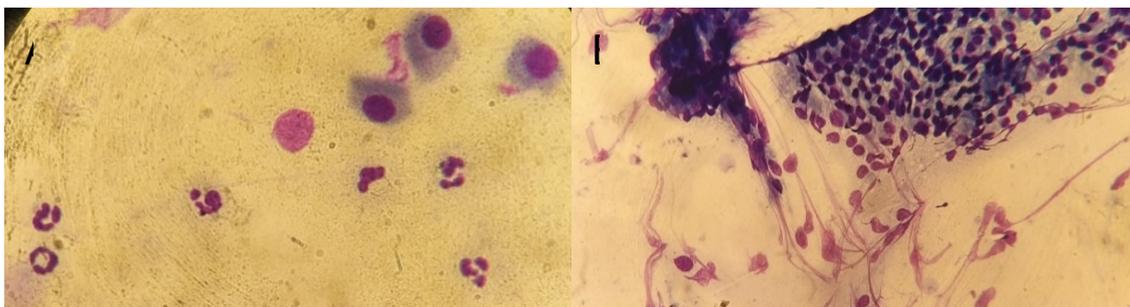
### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Incidência de endometrite

Das 38 éguas examinadas, 55,26% (n=21) foram diagnosticadas com endometrite, ou seja, apresentaram crescimento microbiológico das amostras coletadas. Dos animais com crescimento microbiológico positivo, 80,95% (n=17) apresentaram citologia positiva para endometrite (Figura 1a) e 19,05% (n=4) apresentaram citologia que não indicavam inflamação uterina (Figura 1b). Dos animais não diagnosticados com endometrite (n=17), apenas 1 apresentou citologia com indicativo de inflamação uterina.

Figura 1 – Lâminas de citologia uterina de éguas com histórico de infertilidade

Legenda: A- lâmina de citologia endometrial positiva com presença de neutrófilos e células



típicas da mucosa uterina. B- Lâmina de citologia endometrial negativa para endometrite com presença de muco fisiológico e células típicas da mucosa uterina (aumento de 1000x).

#### 3.2 Isolados identificados por sequenciamento de DNA

Dos 21 animais positivos, foram isoladas 32 colônias. 75% dos isolados (n=24) apresentaram genes com alinhamento no sequenciamento de DNA, revelando 12 espécies distintas: *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Enterococcus gallinarum*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus sciuri*, *Staphylococcus pseudintermedius*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus edaphicus*, *Cladosporium tenuissimum*, *Cladosporium colombiae* e *Rhodotorula glutinis* (Tabela 1). No entanto, 25%

(n=8) das amostras não apresentaram alinhamento no sequenciamento de DNA.

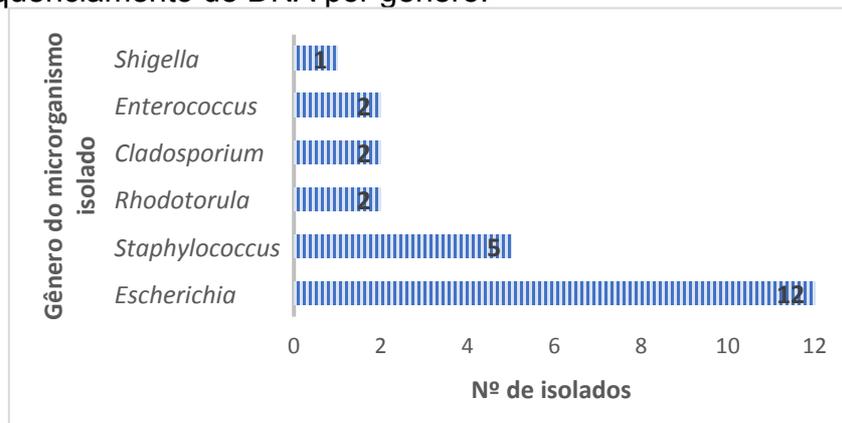
Tabela 1- Espécies de microrganismos isolados de amostras da mucosa uterina de éguas e identificados por sequenciamento de DNA.

ID égua	Citologia	Microrganismo isolado	Identidade de cobertura (%)	Query over (%)
E1	+	<i>Enterococcus faecalis</i>	99,14	98
		<i>Escherichia coli</i>	99,57	100
		<i>Staphylococcus sciuri</i>	99,14	98
E2	+	<i>Escherichia coli</i>	99,36	99
		<i>Escherichia coli</i>	99,36	99
E3	+	<i>Shigella flexneri</i>	98,93	99
E4	-	<i>Escherichia coli</i>	99,35	99
E5	+	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	99,35	98
E6	+	<i>Cladosporium tenuissimum</i>	99,66	100
		<i>Staphylococcus saprophyticus</i>	99,35	98
		<i>Staphylococcus endaphicus</i>	99,14	99
E7	+	<i>Enterococcus gallinarum</i>	99,14	98
E8	-	<i>Escherichia coli</i>	99,35	99
E9	+	<i>Escherichia coli</i>	99,57	100
		<i>Staphylococcus aureus</i>	100	99
E10	+	<i>Escherichia coli</i>	98,72	99
		<i>Escherichia coli</i>	99,35	99
E11	-	<i>Escherichia coli</i>	99,57	99
		<i>Escherichia coli</i>	99,56	98
E12	+	<i>Cladosporium colombiae</i>	98,98	98
		<i>Escherichia coli</i>	99,35	99
E13	+	<i>Escherichia coli</i>	99,57	99
E14	+	<i>Rhodotorula glutinis</i>	99,52	95
E15	+	<i>Rhodotorula glutinis</i>	99,21	98

Legenda: Id égua = Identificação do animal; + = citologia uterina positiva para inflamação; - = citologia uterina negativa para inflamação.

A espécie mais frequente foi *E. coli* (50%), seguida da levedura *R. glutinis* (8,33%). Um total de 80% dos microrganismos identificados eram bactérias e 20% eram fungos e leveduras. Já a distribuição de microrganismos por gênero pode ser vista na figura 2. Alguns animais apresentaram infecção por mais de uma espécie de microrganismo, enquanto outros apresentaram infecção por uma mesma espécie, porém de cepas distintas (Tabela 1).

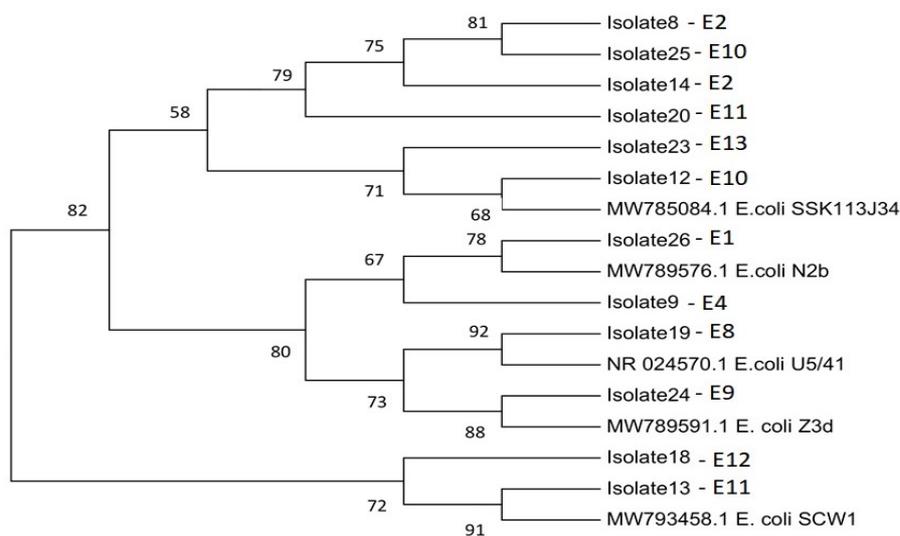
Figura 2 – Gráfico de distribuição dos microrganismos isolados de amostras da mucosa uterina de éguas e identificados por sequenciamento de DNA por gênero.



### 3.3 Árvore filogenética dos isolados de *E. coli*

Através da análise das sequências dos genes codificadores de 16S para os isolados caracterizados como *E. coli* e as sequências de referência do banco de dados NCBI que incluiu *E. coli* N2b (nº de acesso: MW789576.1), *E. coli* SSK113J34 (nº de acesso: MW785084.1), *E. coli* U5/41 (nº de acesso: NR 024570.1), *E. coli* Z3d (nº de acesso: MW789591.1) e a *E. coli* SCW1 (nº de acesso: MW793458.1), uma árvore filogenética foi gerada (Figura 3).

Figura 3 – Árvore filogenética de cepas *E. coli* isoladas do útero de éguas



Legenda: Isolate + nº representa a identificação do isolado de *E. coli* e A letra E + nº representa a identificação do animal do qual foi coletada a amostra para isolar o microrganismo.

A árvore evidencia diferentes origens de *E. coli*, com bootstraps entre 58% e 92%. As cepas de referência do NCBI foram selecionadas por serem as mais similares durante a etapa de identificação dos isolados.

### 3.4 Atividade antimicrobiana de timol e carvacrol

A análise de regressão indicou que os dados se ajustaram a uma equação de resposta à dose sigmoideal de inclinação variável, com valor de  $R^2$  igual ou superior a 0,9560 (Tabela 2). As regressões foram usadas para calcular os valores de  $IC_{50}$  para os isômeros fenólicos para inibir *E. coli*, *S. sciuri* e *R. glutinis* (Tabela 2).

Todos os microrganismos avaliados foram sensíveis ao timol ou carvacrol. Os valores de  $IC_{50}$  foram estatisticamente iguais para os isômeros quando comparados os testes para um mesmo microrganismo. No entanto, os valores de  $IC_{50}$  foram significativamente diferentes quando comparados entre os testes com diferentes microrganismos. Os valores de  $IC_{50}$  foram maiores nos testes de timol e carvacrol contra *S. sciuri*. Já o microrganismo mais sensível aos isômeros fenólicos foi *R. glutinis*, com  $IC_{50}$  significativamente menores

Tabela 2 - Coeficiente de determinação e as concentrações inibitórias médias dos isômeros fenólicos timol e carvacrol contra os microrganismos *E. coli*, *S. sciuri* e *R. glutinis* isolados do útero de éguas.

Fenol x Microrganismo	$IC_{50}$	$R^2$
<i>Timol x E. coli</i>	0,1010 <sup>a</sup>	0,9571
<i>Carvacrol x E. coli</i>	0,07589 <sup>a</sup>	0,9735
<i>Timol x S. sciuri</i>	0,1920 <sup>b</sup>	0,9560
<i>Carvacrol x S. sciuri</i>	0,1968 <sup>b</sup>	0,9660
<i>Timol x R. glutinis</i>	0,03783 <sup>c</sup>	0,9875
<i>Carvacrol x R. glutinis</i>	0,03397 <sup>c</sup>	0,9870

Legenda: Os valores de  $IC_{50}$  com letras diferentes na coluna (a, b, c) são significativamente diferentes (teste de Tukey,  $p < 0,05$ ).

## 4. Discussão

A endometrite bacteriana foi descrita como presente em 60% das éguas com endometrite (PASOLINI et al., 2016). Já neste estudo, as éguas acometidas pela endometrite bacteriana representaram 80%. A maior

~~incidência neste estudo provavelmente se deve. Esse valor se deve, visto que aos critérios de inclusão dos animais, como no presente neste estudo todas as éguas incluídas apresentavam histórico de infertilidade, sendo era de se esperar maior incidência nestes animais que os índices fossem maiores. De forma semelhante, a incidência de Assim como a endometrite fúngica encontrada em 20% dos animais, é superior ao relatado na literatura, possivelmente pela mesma causa, que também é descrita em estudos anteriores com índices inferiores aos 20% encontrados neste estudo (BERNADINO et al., 2007; DASCANIO; LEY; SCHWEIZER, 2000; RIBAS; CARVALHO; STUSSI, 2014).~~

~~Todos os microrganismos identificados neste estudo já foram descritos em estudos anteriores como agentes causadores de endometrite em éguas (ASSAD et al., 2015; FRONTOSO et al., 2008; LEBLANC; MAGSIG; STROMBERG, 2007; NIELSEN et al., 2010).~~ Entretanto ~~Já quanto as espécies identificadas neste estudo,~~ foi encontrada uma grande variedade de microrganismos, se considerarmos o valor da amostra. Essa variedade está relacionada ao uso de meios não seletivos e seletivos para melhor isolamento das bactérias. E, mais evidentemente, ao emprego do PCR e sequenciamento de DNA para a identificação das espécies (LOBANOV et al, 2018), haja vista que a maioria dos estudos identificam o microrganismo através de cultura microbiológica e por vezes os identificam apenas a nível de gênero (PASOLINI et al., 2016).

~~Todos os microrganismos identificados neste estudo já foram descritos em estudos anteriores como agentes causadores de endometrite em éguas (ASSAD et al., 2015; FRONTOSO et al., 2008; LEBLANC; MAGSIG; STROMBERG, 2007; NIELSEN et al., 2010).~~

Dentre as amostras avaliadas, a *E. coli* foi o microrganismo mais frequentemente identificada neste estudo, estando de acordo com estudo que avaliam ~~ae também em alguns estudos de~~ prevalência microbiana uterina em éguas com endometrite (REF). ~~Em um destes estudos foi inferido que essas éguas com endometrite identificada por ????,~~ muitas vezes não apresentavam sinais de inflamação na citologia uterina (NIELSEN et al., 2010; RIDDLE; LEBLANC; STROMBERG, 2007), entretanto.... Resultado semelhante foi encontrado neste estudo, Não obstante, como verificamos neste estudo, das

éguas cujos isolados das amostras uterinas apresentaram alinhamento no sequenciamento de DNA, três éguas com citologia uterina negativa apresentavam infecção uterina somente por *E. coli*. Em contrapartida, um estudo mais recente promoveu a infecção uterina experimental por *E. coli*, para avaliar o processo inflamatório uterino frente a essa bactéria e foi constatado que a inflamação ocorria com apresentação de resultado positivo para inflamação na avaliação citológica~~citologia positiva~~, porém a mesma desaparecia em 3 a 4 dias após ??? (CAMOZZATO, 2014).

Outra provável causa para a não visualização de células inflamatórias na citologia, é uma formação de biofilmes pelos microrganismos (NIELSEN et al., 2010). Geralmente as endometrites com formação de biofilmes podem caracterizar endometrite subclínica, comumente causada por microrganismos Gram-negativos, fungos e microrganismos do gênero *Staphylococcus* (LEBLANC; CAUSEY, 2009). As bactérias do gênero *Enterococcus spp.* são descritas como causadoras de endometrite em diversos estudos, no entanto algumas cepas estão relacionadas a produção de ácido lático e proteção biológica da vagina de éguas (FRAGA et al., 2008). Já a bactéria *Shigella flexneri* é comumente relacionada a isolados uterinos de éguas com pneumovagina (BAHARUDIN; SABRI; MUHAMED, 2019; NEWCOMBE, 2011).

Dos animais que apresentaram endometrite fúngica, todos apresentaram inflamação uterina, duas éguas apresentavam infecção por *Cladosporium tenuissimum* ou *Cladosporium colombiae*. Em estudo de Bernadino et al. (2007), o gênero Aspergillus foi o de maior incidência em endometrites fúngicas em éguas, seguido pelo gênero Cladosporium, este gênero foi considerado em um experimento como o segundo fungo de maior patogenicidade na endometrite fúngica, em primeiro vinha o gênero Aspergillus (BERNADINO et al., 2007).

O fato de *E. coli* ter sido o microrganismo mais encontrado, totalizando 50% dos isolados, tornou interessante a investigação da filogenia dos isolados dessa espécie, onde foi verificada a presença de diversas ramificações, ou seja, cepas de ancestrais próximos distintos, o que sugere que esse alto índice de infecção por *E. coli* não está atrelado a um surto por *E. coli* com infecções devido ao ambiente ou até mesmo iatrogênica durante o manejo reprodutivo. No caso de um surto de contaminação por uma mesma espécie, geralmente,

pode apresentar cepas idênticas ou de ancestralidade próxima, com menos ramificações do que a observada (CHAUDHURI; HENDERSON, 2012).

Quando as propriedades dos isômeros timol e carvacrol foi avaliada sobre os microrganismos isolados e identificados neste estudo, ambos demonstraram ter um efeito antifúngico e antibacteriano. Os valores de IC<sub>50</sub> para timol / carvacrol foram, respectivamente, 0,101 / 0,076 mg/mL para *E. coli*, 0,192 / 0,197 mg/mL para *S. Sciuri* e 0,0378 / 0,0331 mg/mL para *R. glutinis*. O aumento das concentrações de timol ou carvacrol levou a uma redução progressiva no crescimento para todos os microrganismos avaliados.

Os estudos anteriores envolvendo o uso de ativos naturais para tratamento da endometrite equina ainda são escassos. Apenas um estudo propondo o tratamento da endometrite equina com óleos essenciais foi descrito, neste estudo os isolados uterinos bacterianos e fúngicos de *Streptococcus* spp., *Staphylococcus* spp., *Candida albicans* e *Rhodotorula* spp. foram avaliados *in vitro* contra os óleos essenciais comerciais. No experimento, os óleos essenciais de *Origanum vulgare* (66,5% carvacrol) e *Thymus vulgaris* (40,5% timol) obtiveram os melhores resultados, com concentrações inibitórias mínimas variando de 0,07mg / mL para *Streptococcus equi* subsp. *zooepidemicus* para 0,29mg / mL contra *Streptococcus* sp. e *Staphylococcus* spp. E para os isolados causadores de endometrite fúngica, *C. albicans* e *Rhodotorula* spp., com CIMs de 0,46mg / mL e 1,86mg / mL, respectivamente (EBANI et al., 2021).

Quanto aos ativos extraídos de plantas, um estudo avaliou o composto fenólico eugenol quanto a sua atividade antifúngica e ao seu sinergismo com o antifúngico voriconazol no tratamento da endometrite equina, os isolados uterinos fúngicos de *Candida tropicalis* e *Candida kruseiform* foram sensíveis ao eugenol e o mesmo potencializou o efeito do voriconazol quando combinados (SHARIFZADEH; SHOKRI, 2021).

Este é o primeiro estudo avaliando os compostos timol e carvacrol para o tratamento da endometrite equina. Outros estudos avaliaram a eficácia destes compostos para os mesmos microrganismos. Os efeitos antibacterianos de timol e carvacrol para *E. coli* foram atribuídos à sua capacidade de permeabilizar e despolarizar a membrana citoplasmática (XU et al., 2008). Além da capacidade antibacteriana, outro estudo comprovou alta atividade

antibiofilme e antivirulência dos isômeros contra biofilmes bacterianos de *E. coli* resistentes a antibióticos comuns. Os biofilmes bacterianos representam um desafio substancial, e há uma necessidade urgente de estratégias de controle eficazes (ČABARKAPA et al., 2019; LEE; KIM; LEE, 2017).

O carvacrol também se mostrou como um antibiótico natural alternativo contra diferentes espécies de *Staphylococcus* multirresistentes, responsáveis por doenças em animais e humanos (ABED et al., 2021). Neste estudo, o carvacrol inibiu efetivamente o crescimento dos isolados nas concentrações de 0,1, 0,05 e 0,04%. Curiosamente, foram observadas alterações fenotípicas nos isolados após o tratamento com uma concentração de carvacrol de 0,03%, todos os isolados de *Staphylococcus* multirresistentes, mudaram de multirresistentes a suscetíveis a 2 ou 3 antimicrobianos comuns. Ou seja, o carvacrol tornava os microrganismos menos resistentes aos medicamentos convencionais. ~~A~~ a PCR em tempo real foi aplicada para a detecção da expressão diferencial dos genes de resistência aos antibióticos convencionais antes e depois do tratamento com carvacrol e revelou uma redução na expressão destes genes nos isolados de *Staphylococcus* spp (ABED et al., 2021).

~~Essas propriedades antibacterianas e antifúngicas contra microrganismos resistentes são de extrema importância no cenário da endometrite equina, haja vista a crescente resistência dos agentes etiológicos aos medicamentos convencionais disponíveis para o tratamento desta enfermidade (ASSAD et al., 2015; BELTAIRE; CHEONG; COUTINHO DA SILVA, 2012; BENKO et al., 2015; DÍAZ-BERTRANA et al., 2021; WOLNY-KOŁADKA, 2018).~~

Além do potencial antifúngico e antibacteriano (KACHUR; SUNTRES, 2019), os isômeros apresentam propriedades anti-inflamatórias (COSTA et al., 2019), o que pode ser interessante no tratamento da endometrite equina, pensando em um único medicamento que além de inibir o agente etiológico, pode reduzir o processo inflamatório. Também são atribuídas a estes compostos as propriedades antioxidantes (ELBE et al., 2020; GHOLAMI-AHANGARAN; AHMADI-DASTGERDI; KARIMI-DEHKORDI, 2020), sendo de grande valia no tratamento do útero com endometrite, uma vez que esta

enfermidade está associada ao aumento do estresse oxidativo e diminuição da função antioxidante. Este processo oxidativo agrava a inflamação uterina, produz dano celular e, conseqüentemente, acentua a possibilidade de causa subfertilidade ou infertilidade (ABDELNABY et al., 2020).

Em conclusão, de acordo com este estudo, timol e carvacrol apresentaram efeito bactericida contra *E. coli*, *S. sciuri* e fungicida contra *R. glutinis* isolados do útero de éguas. Essas propriedades evidenciadas, somando-se com outras propriedades biológicas conhecidas dos fênóis timol e carvacrol podem estabelecer a base para uma abordagem terapêutica para a endometrite equina, e também uma possível alternativa contra isolados uterinos resistentes a outras drogas ou formulações disponíveis para o tratamento da enfermidade.

#### **Declaração de interesses dos autores**

Nenhum interesse conflitante foi declarado.

#### **Pesquisa ética com animais**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre (ES), Brasil, registro nº 001/2021.

#### **Consentimento informado do proprietário**

O uso dos animais na pesquisa foi autorizado pelo proprietário e veterinário responsável pelos animais.

#### **Fontes de financiamento**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

### **5. Referências**

ABDELNABY, E. A. et al. Uterine hemodynamic patterns, oxidative stress, and chromoendoscopy in mares with endometritis. **Theriogenology**, v. 158, p. 112–120, 1 dez. 2020. DOI: 10.1016/J.THERIOGENOLOGY.2020.09.012

ABED, A. H. et al. Carvacrol Essential Oil: A Natural Antibiotic against Zoonotic Multidrug-Resistant *Staphylococcus* Species Isolated from Diseased Livestock

and Humans. **Antibiotics**, v. 10, n. 11, p. 1328, 2021. DOI: 10.3390/ANTIBIOTICS10111328

ASSAD, N. I. et al. Isolation and antibiotic sensitivity of uterine microbial pathogens - a study of 30 endometritis affected mares. **Intas Polivet**, v. 16, n. 2, p. 223–230, 2015. DOI: 10.1111/j.1365-2621.1990.tb06802.x

BAHARUDIN, F.; SABRI, J.; MUHAMED, M. Bacteria isolated from the reproductive tract of mares with types of pneumovagina in the tropics. **Equine Veterinary Journal**, v. 51, n. S53, p. 6–6, 2 set. 2019.

BELTAIRE, K. A.; CHEONG, S. H.; COUTINHO DA SILVA, M. A. Retrospective study on equine uterine fungal isolates and antifungal susceptibility patterns (1999-2011). **Equine Veterinary Journal**, v. 44, n. 43, p. 84–87, 2012. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2012.00608.x

BENKO, T. et al. Incidence of bacterial pathogens in equine uterine swabs, their antibiotic resistance patterns, and selected reproductive indices in English thoroughbred mares during the foal heat cycle. **Veterinarni Medicina**, v. 60, n. 11, p. 613–620, 2015. DOI: 10.17221/8529-VETMED.

BERNADINO, M. DE L. A. et al. Endometrite equina. Fungos e Bactérias. **Archivos de Zootecnia**, v. 56, p. 875–884, 2007. DOI: 10.1111/j.2042-3306.2012.00608.x.

ČABARKAPA, I. et al. Anti-biofilm activities of essential oils rich in carvacrol and thymol against *Salmonella* Enteritidis. **Biofouling**, v. 35, n. 3, p. 361–375, 2019. DOI: 10.1080/08927014.2019.1610169.

CAMOZZATO, G. C. Resposta inflamatória em éguas após inoculação intrauterina de três diferentes cepas de *Escherichia coli*. 2014. Orientador: Caroline Wolf Dissertação de mestrado – Programa de pós-graduação em Medicina Animal, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2011

COSTA, M. F. et al. Effects of Carvacrol, Thymol and essential oils containing such monoterpenes on wound healing: a systematic review. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 71, n. 2, p. 141–155, 10 jan. 2019. DOI: 10.1111/JPHP.13054.

DASCANIO, J.; LEY, W.; SCHWEIZER, C. How to diagnose and treat fungal endometritis. **AAEP Proceedings**, v. 46, p. 316–318, 2000.

DÍAZ-BERTRANA, M. L. et al. Microbial Prevalence and Antimicrobial Sensitivity in Equine Endometritis in Field Conditions. **Animals**, v. 11, n. 5, p. 1476, 2021. DOI: 10.3390/ANI11051476.

EBANI, V. V. et al. *In vitro* antimicrobial activity of selected essential oils against bacteria and yeasts isolated from the genital tract of mares. **Natural Product Research**, v. 5, p. 1–5, 2021. DOI: 10.1080/14786419.2021.1915307.

ELBE, H. et al. Comparison of ultrastructural changes and the anticarcinogenic effects of thymol and carvacrol on ovarian cancer cells: which is more effective?

**Ultrastructural Pathology**, v. 44, n. 2, p. 193–202, 3 mar. 2020. DOI: 10.1080/01913123.2020.1740366.

FRAGA, M. et al. Vaginal lactic acid bacteria in the mare: Evaluation of the probiotic potential of native *Lactobacillus* spp. and *Enterococcus* spp. strains. **International Journal of General and Molecular Microbiology**, v. 93, n. 1–2, p. 71–78, 2008. DOI: 10.3855/jidc.12076.

FRONTOSO, R. et al. Retrospective study of bacterial isolates and their antimicrobial susceptibilities in equine uteri during fertility problems. **Research in Veterinary Science**, v. 84, n. 1, p. 1–6, 2008. DOI: 10.1016/j.rvsc.2007.02.008.

GHOLAMI-AHANGARAN, M.; AHMADI-DASTGERDI, A.; KARIMI-DEHKORDI, M. Thymol and carvacrol; as antibiotic alternative in green healthy poultry production. **Plant Biotechnology Persa**, v. 2, n. 1, p. 22–25, 1 jun. 2020. DOI: 10.29252/pbp.2.1.22.

HUERTA, B. et al. Essential Oils in the Control of Infections by *Staphylococcus xylosus* in Horses. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 38, p. 19–23, 2016. DOI: 10.1016/j.jevs.2015.11.011.

KACHUR, K.; SUNTRES, Z. The antibacterial properties of phenolic isomers, carvacrol and thymol. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 0, n. 0, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1080/10408398.2019.1675585

LEBLANC, M.; CAUSEY, R. Clinical and subclinical endometritis in the mare: Both threats to fertility. **Reproduction in Domestic Animals**, v. 44, n. 3, p. 10–22, 2009. DOI: 10.1111/j.1439-0531.2009.01485.x

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, n. 3, p. 403–412, 2007. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.04.038

LEBLANC, M. M.; MCKINNON, A. O. Breeding the problem mare. In: MCKINNON, A. O. et al. (Eds.). **Equine reproduction**. 2. ed. Oxford: Wiley Blackwell, 2011. v. 1p. 2620–2642.

LEE, J. H.; KIM, Y. G.; LEE, J. Carvacrol-rich oregano oil and thymol-rich thyme red oil inhibit biofilm formation and the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 123, n. 6, p. 1420–1428, 2017. DOI: 10.1111/JAM.13602.

MARKEY, B. et al. **Clinical Veterinary Microbiology**. 2. ed. Missouri: Mosby Elsevier, 2013.

MCCUE, P. M.; FERRIS, R. A. **Formulary and protocols in equine reproduction**. 1. ed. Colorado: COLORADO STATE UNIVERSITY, 2016.

NEWCOMBE, J. R. Why Are Mares with Pneumovagina Susceptible to Bacterial Endometritis? A Personal Opinion. **Journal of Equine Veterinary**

**Science**, v. 31, n. 4, p. 174–179, 2011. DOI: 10.1016/J.JEVS.2011.02.008.

NIELSEN, J. M. et al. Diagnosis of Endometritis in the Mare Based on Bacteriological and Cytological Examinations of the Endometrium: Comparison of Results Obtained by Swabs and Biopsies. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 30, n. 1, p. 27–30, 2010. DOI: 10.1016/j.jevs.2009.11.006.

PASOLINI, M. P. et al. Endometritis and Infertility in the Mare – The Challenge in Equine Breeding Industry—A Review. **Genital Infections and Infertility**, v. 1, p. 285–328, 2016. DOI: 10.5772/62461.

QUINN, P. J., MARKEY, B. K., LEONARD, F. C., HARTIGAN, P., FANNING, S., & FITZPATRICK, E. **Veterinary Microbiology and Microbial Disease**. 2. ed. Wiley-Blackwell, 2011.

RIBAS, J. A.; CARVALHO, E. Q.; STUSSI, J. P. Endometrite fúngica em éguas: diagnóstico e implicações clínico-patológicas. **Revista Brasileira de Ciência Veterinária**, v. 21, n. 3, p. 204–212, 2014. DOI: 10.4322/rbcv.2014.386

RIDDLE, W. T.; LEBLANC, M. M.; STROMBERG, A. J. Relationships between uterine culture, cytology and pregnancy rates in a Thoroughbred practice. **Theriogenology**, v. 68, n. 3, p. 395–402, 2007. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2007.05.050.

RUA, M. A. S. et al. Diagnostic methods to detect uterus illnesses in mares. **Theriogenology**, v. 114, p. 285–292, 2018. DOI: 10.1016/j.theriogenology.2018.03.042

SHARIFZADEH, A.; SHOKRI, H. *In vitro* synergy of eugenol on the antifungal effects of voriconazole against *Candida tropicalis* and *Candida krusei* strains isolated from the genital tract of mares. **Equine Veterinary Journal**, v. 53, n. 1, p. 94–101, 2021. DOI: 10.1111/evj.13268.

VAN DEN HOVEN, R. et al. Study of the effect of Bronchipret on the lung function of five Austrian saddle horses suffering recurrent airway obstruction (heaves). **Veterinary Record**, v. 152, n. 18, p. 555–557, 3 maio 2003. DOI: 10.1136/vr.152.18.555.

WOLNY-KOŁADKA, K. Resistance to Antibiotics and the Occurrence of Genes Responsible for the Development of Methicillin Resistance in *Staphylococcus* Bacteria Isolated From the Environment of Horse Riding Centers. **Journal of Equine Veterinary Science**, v. 61, p. 65–71, 1 fev. 2018. DOI: 10.1016/J.JEVS.2017.11.010.

XU, J. et al. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v. 47, n. 3, p. 174–179, 1 set. 2008. DOI: 10.1111/J.1472-765X.2008.02407.X.

ZGODA, J. R.; PORTER, J. R. A Convenient Microdilution Method for Screening Natural Products Against Bacteria and Fungi. **Pharmaceutical Biology**, v. 39, n. 3, p. 221–225, 2008. DOI: 10.1076/phbi.39.3.221.5934.

