

POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO DIMETILSULFÓXIDO (DMSO) FRENTE A DIVERSAS CEPAS BACTERIANAS

Cayque de Souza Farias (1); Ísis Misaelly Rodrigues Trajano (2); José Nildomarque Júnior (3); Antônio Carlos Santos Rocha Júnior (4); Zilka Nanes Lima (5)

(1- Graduando em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, cayque.farias@hotmail.com; 2-
Graduanda em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, isismisaelly@hotmail.com; 3-
Graduando em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, juniorsilvamed06@gmail.com ; 4-
Graduando em Farmácia, Universidade Estadual da Paraíba, antoniojunior.eng@gmail.com; 5-
Professora Orientadora, Universidade Estadual da Paraíba, zilkananeslima@gmail.com)

Resumo: Sintetizado pela primeira vez em 1867 na Alemanha, por um químico de nacionalidade russa, Alexander Saytzeff, o dimetilsulfóxido (DMSO) é um composto químico conhecido desde o século XIX como um solvente orgânico potente. Por ser um subproduto da indústria de extração de celulose, passou a ser largamente utilizado a partir da década de quarenta do século XX, para fins industriais e no início de 1960, foi introduzido como medicinal. Com a descoberta, na década de 1980, de suas propriedades antiinflamatória e citoprotetora, o DMSO passou a constituir-se, até os dias atuais, em um dos agentes farmacêuticos mais estudados. Sendo descrita também a sua capacidade de melhorar a atividade antimicrobiana de alguns fármacos. No sentido de se verificar a atividade antibacteriana do DMSO, vários testes foram realizados, entre os meses de Agosto de 2017 e Agosto de 2018, utilizando-se o método de microdiluição em caldo em placa de Elisa, fazendo-se uso do DMSO em diferentes concentrações (2,5% a 20%) frente a diversas cepas bacterianas: *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* (isolado clínico – Infecção do Trato Urinário (ITU), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans/ hirae* derivada, *Staphylococcus* spp Resistente a Novobiocina e não saprophyticus (isolado de fossas nasais) todas cepas ATCC e IAL, a fim de se conhecer a sua concentração inibitória mínima, e de se verificar se o DMSO realmente pode vir a potencializar a ação de um agente antimicrobiano.

Palavras-chave: DMSO, Atividade Antimicrobiana, Concentração Inibitória Mínima.

INTRODUÇÃO

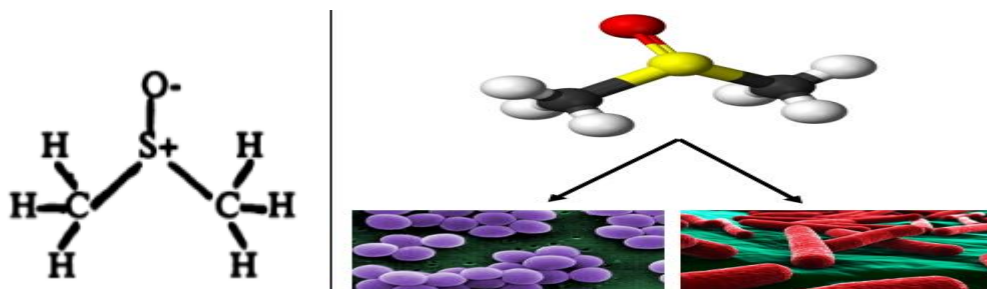
Propriedades do Dimetilsulfóxido (DMSO)

O DMSO é um composto químico orgânico de fórmula C_2H_6SO (Rosenbaum, 1965), peso molecular 78g/mol (Carpenter,1994) e temperatura de congelamento $18,5^{\circ}C$ (Brayton, 1986) e ponto de ebulição de $189^{\circ}C$. Possui uma molécula anfipática, composta por um domínio polar caracterizado por um sulfonil e dois domínios metílicos não polares, o que o torna capaz de solubilizar substâncias polares e apolares. Esta propriedade possui grande importância, tendo em vista que o DMSO pode atuar como veículo intracelularmente, já que permite que agentes terapêuticos e tóxicos não solúveis em água possam vir a solubilizar.

A elevada capacidade higroscópica decorre da sua intensa afinidade pelo hidrogênio, formando pontes mais fortes que às formadas entre moléculas de água. Isso faz com que o DMSO puro passe rapidamente para a concentração entre 66-67% se for deixado exposto ao ar ambiente (Brayton, 1986), razão porque deve ser mantido em frasco hermeticamente fechado (Alsup & DeBowes, 1984).

Uma reação exotérmica é verificada quando o DMSO administrado topicamente reage com a água do ar e dos tecidos (Brayton, 1986). Essa particularidade química tem relação com várias propriedades da droga e com sua capacidade solvente, em particular sobre o acrílico e o poliuretano (Rosenbaum 1965), exigindo assim cuidados para não reagir com bandagens, paramentos e equipamentos confeccionados com esses materiais. É um subproduto da fábrica de papel (Rosenbaum,1965; Adamson,1966; Briton,1982; Brayton,1986). Na Europa é obtido a partir do carvão e do petróleo (Briton,1982). A sua extrema capacidade de penetração e difusão há muito é motivo, de sua inclusão como veículo componente de defensivos agrícolas (Rosenbaum, 1965). Abaixo será apresentada a estrutura do DMSO:

Figura 01: Estrutura Química do DMSO



Ação terapêutica e outras ações do DMSO

Já foram verificadas acima de trinta propriedades farmacológicas e terapêuticas do DMSO as quais resultam da sua capacidade de interagir ou combinar com ácidos nucleicos, carboidratos, lipídeos, proteínas e muitas drogas sem alterar de forma irreversível a configuração molecular (Sojka et al. 1990). O DMSO vem sendo empregado há várias décadas em medicina humana e veterinária (Jacob, 1982; Alves, 1998).

- **Penetração e difusão** – A particular habilidade em transpor a pele íntegra, difundindo-se em todos os tecidos e fluídos orgânicos faz do DMSO uma arma poderosa, frequentemente útil no tratamento de lesões localizadas em tecidos densos ou de difícil acesso.
- **Carreadora** – Devido à intensa capacidade de penetração, muitas substâncias quando associadas ao DMSO podem ser carreadas através das membranas (Brayton, 1986; Blythe et al.1986; Rose & Hodgson, 1993; Rand-Luby et al. 1996). Essa propriedade tem sido utilizada quando as lesões se localizam em tecidos que apresentam dificuldade à penetração e difusão medicamentosa, como também em casos de pneumonias abscedantes.
- **Potencializadora** – A propriedade anterior pode ter relações com essa. Ambas devem ser consideradas criteriosamente pelo clínico, antes de administrar a droga, já que podem ser altamente benéficas (Blythe et al.1986; Rose & Hodgson, 1993) ou maléficas quando o paciente já está sob efeito de drogas ou dosagens limites, devendo ser ressaltado os anestésicos gerais, os anticolinestésicos (Stone, 1993), etc.
- **Remoção de radicais livres de oxigênio (RLO)** – Como parte do complexo bioquímico da inflamação os RLO ocupam posição de destaque na fisiopatologia da injúria de reperfusão. O DMSO tem propriedade neutralizar a ação lesiva dos radicais hidroxil (Arden et al. 1989; Soyka 1990; Mackay, 1992; Rose & Hodgson, 1993; Speirs, 1994), por isso é benéfico a todo tecido sob isquemia ainda com possibilidade vital, em particular do trato gastroentérico onde os RLO produzem aumento da permeabilidade, ulcerações e necrose epitelial (Soyka 1990).
- **Imunomoduladora** – Além de inibir a quimiotaxia de polimorfonucleares (PMN) no espaço pleural, amplia a disponibilidade de receptores na membrana celular, facilitando a interação de antígenos (Soyka 1990).

- **Antiinflamatória** – A partir da década de sessenta essa propriedade tem sido considerada miraculosa e vastamente conhecida (Blythe, 1986; Brayton, 1986), resultando de mecanismos múltiplos (Alsup & DeBowes, 1984; Soyka 1990), entre os quais são citados: o antagonismo das substâncias originadas da cascata do ácido aracdônico (Stone, 1993) e do fator de agregação plaquetária (Brayton, 1986), inibição da infiltração de PMN (Alsup,1984; Soyka, 1990; Rose & Hodgson, 1993), remoção dos RLO produzidos pelos neutrófilos, (Blythe et al.1986; Soyka, 1990; Henry, 1992; Parks, 1995; Mackay, 1996; Murray, 1996) os quais estão envolvidos na evolução do distúrbio circulatório a caminho da necrose. Apesar dos vários mecanismos citados, o DMSO é mais eficaz na inflamação aguda (Rose & Hodgson, 1993).
- **Vasodilatadora** – É resultante da ação histaminogênica (Brayton, 1986; Stone,1993) e anticolinesterásica (Brayton, 1986) somada à vasodilatação no leito capilar subdermal e a desagregação plaquetária que resultam em importante proteção contra lesão isquêmica (Brayton, 1986; Rand-Luby et al. 1996), sendo reconhecida como importante na garantia de enxertos.
- **Diurética** – Essa propriedade pode compor o mecanismo pelo qual a droga reverte anomalias neurológicas decorrentes de traumatismos cranianos, sem serem observadas alterações eletrolíticas (Blythe et al.1986; Soyka 1990) em pacientes normovolêmicos.
- **Analgésica** – Deve-se indiretamente à propriedade anti-inflamatória, e diretamente ao bloqueio químico da fibra C em nervos aferentes periféricos (Stone, 1993) além da ação central análoga a morfina (Rosenbaum 1965; Wood & Wood, 1975; Haigler & Spring, 1983; Brayton, 1986). Por outro lado, essa ação central é postulada não envolver receptores opióides (Brayton, 1986).
- **Miorrelaxante** – Associado a efeitos tranquilizante e sedativo, tem sido observado em várias espécies (Rosenbaum, 1965; Brayton, 1986; Stone, 1993). Essa propriedade sem dúvida decorre principalmente do conforto resultante das outras propriedades, ou seja, anti-inflamatórias e analgésicas.
- **Citoprotetora** – (Koterba et al. 1990) Sua capacidade foi considerada superior ao do glicerol para preservar eritrócitos e espermatozoides (Brayton, 1986).
- **Antimicrobiana** – Tem sido documentada por vários pesquisadores (Alsup & DeBowes, 1984; Stone, 1993; Rose

& Hodgson, 1993). O mecanismo de ação dos aminoglicosídeos e do cloranfenicol, por exemplo, depende, fundamentalmente, da veiculação dos princípios ativos para o interior dos microrganismos, proporcionando a atuação destas drogas no ribossomo bacteriano (TAVARES, 1996).

- O DMSO pode ser utilizado ainda como: excipiente para formulações em terapêutica veterinária, como um grupo controle para teste de produtos naturais, para o tratamento de células cultivadas em determinados experimentos e vários estudos *in vitro*.

Toxicidade do DMSO

Apesar das múltiplas aplicações do DMSO, suas características fisiológicas e farmacológicas bem como seus efeitos não são totalmente compreendidos, novas investigações sobre suas atividades farmacológicas e qual concentração de uso é segura são necessárias.

É importante citar as contradições existentes entre os pesquisadores, como entre os que advertem sobre o potencial cancerígeno do DMSO e os que o indicam como adjuvante da terapia anticancerígena.

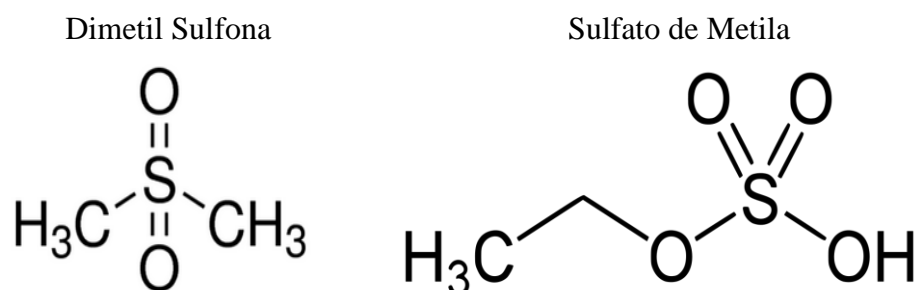
Ao contrário do que foi inicialmente divulgado, a toxicidade do DMSO é reconhecidamente baixa (Brayton, 1986; Soyka, 1990; Rose & Hodgson, 1993; Stone, 1993). Alguns fatores devem ser levados em consideração, como por exemplo, particularidades fisiológicas de cada espécie animal, variabilidades e individualidades, estado de saúde do paciente, estágio da afecção, tipo de lesão, além da dose e concentração a serem empregadas e frequência de administração do fármaco (Carpenter; Angel; Morgan, 1994; Rand-Luby et al., 1996).

Alguns efeitos colaterais podem ser observados, como: o aparecimento de um odor desagradável, semelhante ao de alho, pela via respiratório de eliminação do DMSO, hemólise, hemoglobinúria, cólica, diarreia e tremores musculares, teratogênese, reações cutâneas e alteração de lentes oculares.

Mesmo diante dos efeitos colaterais, quando existe impropriedade na indicação, na concentração, na dosagem ou na velocidade de administração, não se observou anemia nem insuficiência renal (Appell et al. 1992).

A dimetil sulfona e o sulfato de dimetila são os principais produtos da degradação (Hucker et al.1967; Thews et al.1975) A excreção principal é por via urinária embora a via respiratória, participando com menos de 3% (Brayton, 1986) parece, pelo odor, ser a principal. A seguir são apresentados os principais produtos de degradação do DMSO:

Figura 02: Principais Produtos de Degradação do DMSO



Atividade antimicrobiana do DMSO

O DMSO é um solvente orgânico bastante utilizado na microbiologia. Devido à sua característica anfipática, tem uma capacidade maior do que a da água de dissolver certos antibióticos ou futuros candidatos a antibióticos, além de potencializar a ação destes, uma vez que por possuir a capacidade de facilitar o transporte através de membranas biológicas, faz com que a molécula com atividade biológica alcance mais facilmente seu sítio alvo.

Porém, quando se deseja conhecer a atividade antibacteriana de uma molécula em estudo, não é desejável que o DMSO apresente atividade tóxica contra estes microorganismos, uma vez que a atividade dele pode vir a ser facilmente atribuída como sendo atividade da molécula analisada, o que pode levar o pesquisador a cometer um engano.

Sendo assim, a realização de testes se faz de grande importância, uma vez que permitiram conhecer um pouco a respeito da concentração inibitória mínima deste solvente frente a diversas cepas bacterianas. Conhecendo-se assim, sua ação terapêutica frente às espécies testadas, bem como a sua atividade potencializadora do efeito atingido por as moléculas testadas.

METODOLOGIA

Culturas Bacterianas: Entre os meses de agosto de 2016 e agosto de 2017 foram realizados ensaios *in vitro* constatando-se a ação

(83) 3322.3222

contato@conbracis.com.br

www.conbracis.com.br

antimicrobiana do DMSO frente a diferentes cepas de bactérias (*Shigella flexneri* – ATCC 12022, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae* ATCC 700603, *Proteus mirabilis* – ATCC 25933, *Pseudomonas aeruginosa* – ATCC 27853, *Staphylococcus epidermidis* – ATCC 12228, *Staphylococcus saprophyticus* (isolado clínico – Infecção do Trato Urinário (ITU), *Enterococcus faecalis* – ATCC 29212, *Enterococcus durans/ hirae* derivada SS1225/IAL, *Staphylococcus* spp Resistente a Novobiocina e *Staphylococcus* não saprophyticus (isolado de fossas nasais), da Coleção do Laboratório de Resistência Microbiana Clínica e Contemporânea (LaRMiCC) do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Estadual da Paraíba, determinando-se as concentrações inibitórias mínimas através do método de microdiluição em caldo.

Preparo da suspensão bacteriana: Foi utilizado o método de suspensão direta de colônias, proposto pelo CLSI M7-A6, 2014, após 18-24 horas de incubação a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, preparou-se o inóculo, fazendo suspensão direta, em solução salina, a partir de colônias isoladas em ágar Mueller Hinton. Ajustou-se a suspensão segundo a solução padrão de McFarland 0,5, em comprimento de onda de 625 nm, para que a solução apresentasse uma absorvância de 0,08 -0,10. (NCCLS, 2003).

Preparo da solução de DMSO a 20%: Foi preparado em frasco âmbar hermeticamente fechado, na razão DMSO/Água destilada estéril de 20%.

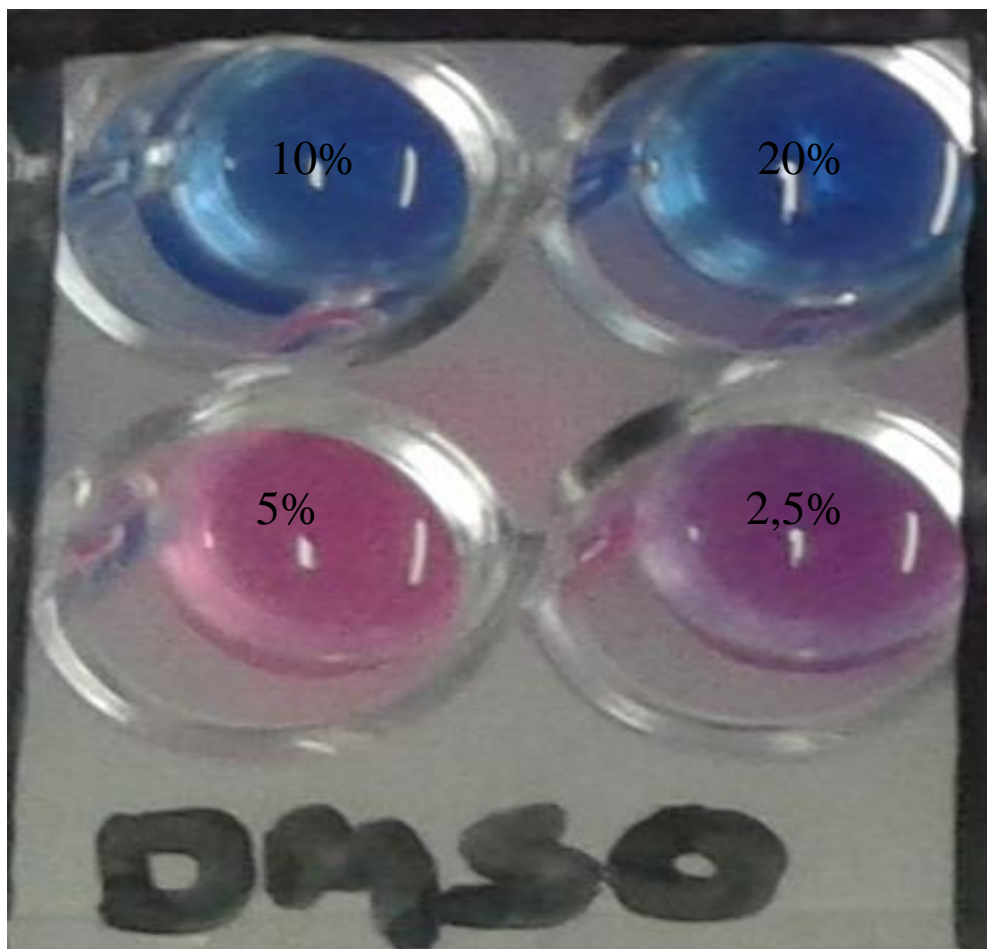
Teste de sensibilidade *in vitro* para bactérias frente ao DMSO: Foram destinados para o teste do DMSO, os poços 2 e 3 das linhas G e H, o DMSO foi posto no poço 3 da linha G, depois homogeneizado e passado para o poço 2 da mesma linha, e homogeneizado novamente e passado para o poço 3 da linha H e por fim para o 2, ficando este assim, com concentração variando de 20 a 2,5%. O teste foi feito em duas placas de elisa com 96 poços para cada bactéria, a fim de se assegurar a confiabilidade do método.

Testes de sensibilidade *in vitro* para bactérias: Foram utilizados derivados moléculas sintéticas, onde a solução mãe, estoque e teste foram preparadas respectivamente com 20%, 10% e 5% de DMSO. As concentrações utilizadas variaram de 1024 a 1 $\mu\text{g/mL}$. O meio de cultura utilizado nos testes foi o Caldo Mueller Hinton (MH), a droga controle utilizada foi a amicacina. Os orifícios das microplacas (96 poços) foram preenchidos com 100 μL de Caldo MH, em seguida foi adicionada a droga a ser testada da coluna 12 à coluna 2 da microplaca, em forma de triplicata, exceto na coluna 1, que foi destinada ao controle de crescimento bacteriano. Foram adicionados 100 μL do antibiótico controle do poço 12 da coluna G até o poço 4 da mesma linha e do poço 12 da

linha H até o poço 4 da linha H. A concentração do antibiótico variou de 1024 a 0,0078125 $\mu\text{g/mL}$. Foram adicionados ainda 10 μL das suspensões dos micro-organismos em cada orifício das microplacas, com exceção dos poços 1 da linha G e H, que foram destinados ao teste de esterilidade do meio. Foram reservados os poços 2 e 3 das linhas G e H para o controle negativo referente aos solvente, que fez uso do DMSO.





































Leitura do experimento: Após a realização dos experimentos e incubação da placa na estufa por 20 ± 2 horas a $35 \pm 2^\circ\text{C}$, adicionou-se 20 μL do corante resazurina na concentração de 0,01% para facilitar a realização da leitura. Após o período de aproximadamente 4 horas, realizou-se a leitura da placa, na qual a cor azul representava a ausência do crescimento bacteriano e a cor rosa o crescimento bacteriano (Palomino et al. 2002). A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazin-3-onda-10-óxido) é considerada o indicador mais utilizado em condições de redução em meio de cultura (FUKUSHIMA et al., 2003). A forma oxidada é azul (não fluorescente/ célula não viável) e a forma reduzida é rósea (fluorescente/célula viável).

Figura 03: Teste do DMSO para *Pseudomonas aeruginosa*






RESULTADOS E DISCURSSÃO

Tabela 01: Concentração Inibitória Mínima do DMSO

BACTÉRIA TESTADA	100 µL DMSO A 20%	100 µL DMSO A 10%	100 µL DMSO A 5%	100 µL DMSO A 2,5%
<i>Shigella flexneri</i> – ATCC 12022				
<i>Klebsiella pneumoniae</i> – subsp. <i>pneumoniae</i> - ATCC 700603				
<i>Proteus mirabilis</i> – ATCC 25933				
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> – ATCC 27853				
<i>Staphylococcus epidermidis</i> – ATCC 12228				
<i>Staphylococcus saprophyticus</i> (ITU)				
<i>Enterococcus faecalis</i> – ATCC 29212				
<i>Enterococcus durans/ hirae</i> derivada SS1225/IAL				
<i>Staphylococcus</i> spp R a N				

Legenda:

	Concentração do DMSO Capaz de Inibir o Crescimento Visível Bacteriano
	Concentração do DMSO Capaz de Inibir Parcialmente o Crescimento Bacteriano
	Crescimento Bacteriano Visível

Ao se analisar os resultados obtidos, é possível observar que para a maioria das bactérias (*Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus* (ITU), *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus* spp R a N) o DMSO só conseguiu inibir totalmente o crescimento visível em concentrações maiores (20%), havendo portanto crescimento satisfatório da bactéria nos demais poços, ou sendo inibido apenas parcialmente, como é o caso da *Shigella flexneri*, da *Enterococcus faecalis* e da *Enterococcus durans/hirae*. O que significa que a concentração utilizada para o preparo das soluções testadas (5%), não foi capaz de interferir nos resultados obtidos para a Concentração Inibitória Mínima destas moléculas, uma vez que esta concentração está bem abaixo da considerada capaz de inibir o crescimento visível destes micro-organismos.

Clinicamente falando, se concentrações acima de 20% de DMSO (Alsup & DeBowes, 1984; Stone, 1993) for administrada por via IV a um paciente, ou se a solução a 20% for administrada rapidamente por esta via (Blythe et al. 1986; Appell et al. 1992; Henry 1992; Rose & Hodgson, 1993; Rand-Luby et al. 1996), uma das possíveis reações adversas a acontecer pode ser a hemólise. Pode ocorrer ainda Hemoglobinúria transitória, não alterando o hematócrito. Hemoglobinúria - Concentrações de DMSO acima de 20% em doses acima de 1,0g/kg/IV, causam hemólise com hemoglobinúria a qual pode determinar nefrotoxicidade, que, não deve ser considerada como efeito colateral da droga já que essa, inclusive, está indicado na insuficiência renal isquêmica (Blythe et al. 1986; Koterba et al. 1990).

Já para as bactérias *Pseudomonas aeruginosa*, uma bactéria gram-negativa e *Staphylococcus epidermidis*, uma bactéria gram-positiva, concentrações menores de DMSO (10%) já foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. Portanto, mesmo em concentrações menores, o DMSO mostra-se efetivo perante estas bactérias, o que representa que ele pode vir a potencializar a ação antibacteriana.

CONCLUSÃO

Este trabalho de pesquisa buscou conhecer o potencial do DMSO frente à diferentes cepas bacterianas: *Shigella flexneri*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* (isolado clínico – Infecção do Trato Urinário (ITU), *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans/ hirae*, *Staphylococcus* spp Resistente a Novobiocina e *Staphylococcus* não saprophyticus (isolado de fossas nasais), determinando-se a sua Concentração Inibitória Mínima frente a estas bactérias.

Por fim, chegou-se à concentração de 20% para 100 µL de DMSO como sendo a mínima capaz de inibir o crescimento visível perante às bactérias: *Shigella flexneri*, *Enterococcus faecalis*, *Enterococcus durans/ hirae*, *Klebsiella pneumoniae* subsp. *pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Staphylococcus* spp R a N, e as menores concentrações de DMSO (10% e 5%) capazes de inibir apenas o crescimento das bactérias *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus epidermidis* respectivamente.

Desse modo, é possível se inferir que o DMSO possui sim atividade antimicrobiana, porém geralmente apenas em concentrações maiores, nas quais evita-se a utilização clínica em humanos ou animais, já que esta pode vir a provocar reações adversas como hemólise e hemoglobinúria ou se administra lentamente.

Foi possível se aferir ainda que a concentração do DMSO de 5% , utilizada para o preparo das moléculas testadas pouco veio a interferir e influenciar nos resultados de Concentração Inibitória Mínima encontrada. o que significa que o DMSO utilizado pouco interfere na ação de agentes antibacterianos.

Dessa maneira, novos estudos fazem-se necessários, a fim de se conhecer mais a respeito da atividade do DMSO frente à diferentes cepas bacterianas, como por exemplo a fim de elucidar o seu mecanismo de ação e se este possui a segurança e eficácia necessária para que possa ser administrado clinicamente sem trazer consigo reações indesejáveis ao paciente.

REFERÊNCIAS

ALSUP, E.M.; DeBOWES, R.M. Dimethyl sulfoxide. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.185, n.09, p.1011-1014, 1984.

APPELL, L.H., BLYTHE, L.L., LASSEN, E.D., CRAIG, A.M., **Adverse effects of rapid intravenous DMSO administration on horses**. *J. Equine. Vet. Sc.* v.12, p.215-218, 1992.

BLYTHE, L.L.; CRAIG, A.M.; CHRISTENSEN, J.M.; APPELL, L.H.; SLIZESKI, M.L. Pharmacokinetic disposition of dimethyl sulfoxide administered intravenously to horses. **American Journal of Veterinary Research**, v.47, n.08, p.1739-1743, 1986.

BRAYTON, C.F. Dimethyl sulfoxide (DMSO): a review. **Cornell Veterinarian**, v.76, n.01, p.76-90, 1986.

BRITO, R.C., SILVA, G.N., FARIAS, T.C., FERREIRA,P.B., FERREIRA,S.B. **Standardization of the Safety Level of the Use of DMSO in Viability Assays in Bacterial Cells**. *MOL2NET*, 2017, 3, doi:10.3390/mol2net-03-xxxx

ROSENBAUM, E.E.; HERSCHLER, R.J.; JACOB, S.W. Dimethyl sulfoxide in musculoskeletal disorders. **Journal of the American Medical Association**, v.192, n.02, p.309-313, 1965.

Fukushima, R.S.; Weimer, P.J.; Kunz, D. **Photocatalytic interaction of resazurin N-oxide with cysteine optimizes preparation of anaerobic culture medium**. *Anaerobe*, 8: 29-34, 2002.

HUCKER, H.B., MILLER, J.K., HORCHBERT, A. et al. **Studies in the absorption, excretion and metabolism of dimethyl sulfoxide (DMSO) in man**. *J. Pharmacol. Exp. Therap.* v.155, p.309-319, 1967.

PALOMINO, J.C.; MARTIN, A.; CAMACHO, M.; GUERRA, H.; SWINGS, J.; PORTAELS, F. **Resazurin Microtiter Assay Plate: Simple and Inexpensive Method for Detection of Drug Resistance in *Mycobacterium tuberculosis***. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v.46, n.8, p.2720-2722, 2002.

ROSE, R.J., HODGSON, D.R. **Manual of equine practice**. Philadelphia: Saunders.1993, 532p.

RAND-LUBY, L., POMMIER, R.F., WILLIAMS, S.T. et al. **Improved outcome of surgical flaps treated with topical dimethylsulfoxide**. *Ann. Surg.* v.224, n.4, p.583-590, 1996.

SOJKA, E.J., KIMMICK, S.V.B., CARISON, G.P. et al. **Dimethyl sulfoxide update - New applications and dosing methods**. *Proceed. Am. Assoc. Equine Practit.* v.36, p.683-690, 1990

STONE,R.W. Clinical updates on the use of dimethyl sulfoxide. **Canine Practice**. v.18, p.16-19, 1993

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Fifth Informational Supplement**. CLSI document. M100-S25. Wayne. PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2015