

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

POTENCIAL ANTIBACTERIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Melaleuca alternifolia*,
Mentha piperita e *Rosmarinus officinalis* EM ISOLADOS DE *Staphylococcus*
pseudintermedius

JÚLIA MEIRA

Botucatu - SP

Abril de 2023

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA E ZOOTECNIA
CAMPUS DE BOTUCATU

POTENCIAL ANTIBACTERIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Melaleuca alternifolia*,
Mentha piperita e *Rosmarinus officinalis* EM ISOLADOS DE *Staphylococcus*
pseudintermedius

JÚLIA MEIRA

Dissertação apresentada junto ao Programa
de Pós-graduação em Medicina Veterinária
para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Henrique de
Araújo Machado

Coorientador: Prof. Dr. Adriano Sakai
Okamoto

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Meira, Júlia.

Potencial antibacteriano dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* em isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* / Júlia Meira. - Botucatu, 2023

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

Orientador: Luiz Henrique de Araújo Machado

Coorientador: Adriano Sakai Okamoto

Capes: 50501062

1. Cães - Doenças. 2. Pele de animais. 3. Antibacterianos.
4. Terpenos. 5. Óleo de melaleuca. 6. Tea tree oil.

Palavras-chave: MRSP; Piodermite canina; Resistência bacteriana; Tea tree oil; Terpenos.

Nome da Autora: Júlia Meira

Título: POTENCIAL ANTIBACTERIANO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* EM ISOLADOS DE *Staphylococcus pseudintermedius*

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof. Dr. Luiz Henrique de Araújo Machado
Orientador
Departamento de Clínica Veterinária
FMVZ – UNESP – Botucatu

Dra. Ana Flávia Marques Pereira
Membro
Departamento de Ciências Químicas e Biológicas
IBB – UNESP – Botucatu

Profa. Dra. Marcy Lancia Pereira
Membro
Departamento de Biociências e Saúde Única
UFSC – Curitibanos

Data da Defesa: 25 de abril de 2023.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente aos meus pais, Marcos e Mércia, que sempre me ajudaram e sempre me ensinaram a seguir os meus sonhos.

Ao meu orientador Henrique por toda ajuda e ensinamentos compartilhados. Ao meu coorientador Adriano por tornar essa dissertação possível, tanto no aspecto técnico como laboratorial.

Aos profissionais do Instituto de Biociências (IBB) - Botucatu/SP, Professor Ary, Ana Flávia e Tatiane por todo auxílio e conhecimentos transmitidos.

Aos meus colegas de laboratório Gabriele e Guilherme que me auxiliaram na realização dos ensaios para a minha dissertação.

Ao Rafael e Renee que desde o início do meu mestrado sempre me apoiaram e foram essenciais para a conclusão da minha dissertação.

Aos amigos que conquistei em Botucatu, Antoniel, Felipe e Guilherme Pupulim, que foram importantes para minha evolução pessoal e profissional.

Aos meus amigos de longa data que se fizeram presentes mesmo com a distância e mudança de rotina, Gui Back, Dudis e Cinthia.

Às minhas colegas de pós-graduação, Victória, Danielle, Juliana e Thaline pelo crescimento da nossa amizade.

Aos meus amores de quatro patas Hórus, Mabel e Lancel.

Ao meu companheiro Lucas, por todo apoio e parceria. Sou eternamente grata por você ser o amor da minha vida.

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO II

Table 1. Density and major compounds obtained according to the analysis certificate by the company By Samia® Aromatherapy.

Table 2. *In vitro* microbial susceptibility profile performed by disc diffusion technique of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) and methicillin-susceptible *S. pseudintermedius* (MSSP) isolates.

Table 3. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) in $\mu\text{g/mL}$ of the essential oils from *M.alternifolia*, *R.officinalis*, *M.piperita* and the antibiotics Amoxicillin + Potassium Clavulanate and Cephalexin.

Table 4. Minimum bactericidal concentration (MBC) in $\mu\text{g/mL}$ of the essential oils from *M.alternifolia*, *R. officinalis*, *M. piperita* and the antibiotics Amoxicillin + Potassium Clavulanate and Cephalexin.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO II

Figure 1: Microtiter plate used in the broth microdilution assay against MSSP isolate demonstrating the MIC value *M. piperita* EO (5333 µg/mL) after adding resazurin (0.01%). Purple wells indicate concentrations without bacterial growth, and pink wells with bacterial growth.

LISTA DE ABREVIATURAS

BHA	Brain Heart Infusion Ágar
BHI	Brain Heart Infusion
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CL	Clavulanato
MDR	Multidrug-resistant
MHC	Mueller Hinton Caldo
MRS	<i>Staphylococcus</i> resistente à meticilina
MRSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente à meticilina
MSSP	<i>Staphylococcus pseudintermedius</i> suscetível à meticilina
OE	Óleo Essencial
OEs	Óleos Essenciais
PBP2a	Proteína de ligação da penicilina
PCR	Polimerase Chain Reaction
SCC	Staphylococcal Cassette Chromosome
SIG	Staphylococcus Intermedius Group
TTO	Tea Tree Oil

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
H	Hora
mg	Miligramma
min	Minuto
ml	Mililitro
µg	Micrograma
µl	Microlitro

SUMÁRIO

RESUMO	20
ABSTRACT	21
CAPÍTULO I	22
1. INTRODUÇÃO	23
2. REVISÃO DE LITERATURA	24
2.1. Piodermite canina.....	24
2.2. <i>Staphylococcus spp.</i>	25
2.2.1. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i>	25
2.2.2. <i>Staphylococcus pseudintermedius</i> resistente à metilina (MRSP).....	26
2.3. Óleos essenciais.....	27
2.3.1. <i>Melaleuca alternifolia</i> - Tea Tree Oil (TTO).....	30
2.3.2. <i>Mentha piperita</i> – Hortelã-pimenta.....	30
2.3.3. <i>Rosmarinus officinalis</i> - Alecrim.....	31
3. OBJETIVO	32
3.1. Objetivo geral	32
3.2. Objetivos específicos	32
CAPÍTULO II – Artigo Científico	33
CAPÍTULO III	47
Discussão geral	48
Conclusões finais	50
REFERÊNCIAS	51

MEIRA, J. **Potencial antibacteriano dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* em isolados de *Staphylococcus pseudintermedius***. Botucatu, 2023. 51p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

RESUMO

A bactéria *Staphylococcus pseudintermedius* é um agente oportunista relacionado à piodermite canina e está presente em folículos pilosos. Além disso, é considerada a principal causa da uso de antibióticos em pequenos animais. O isolamento de *S. pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) vêm sendo relatado frequentemente na rotina clínica veterinária de pequenos animais e o uso de óleos essenciais (OEs) tornou-se uma alternativa terapêutica. O objetivo deste estudo foi avaliar se óleos essenciais possuem efeito antibacteriano sobre isolados de *S. pseudintermedius* resistente e suscetível à meticilina, originados de animais com piodermite canina. Foi utilizada a técnica de microdiluição seriada para obter a concentração inibitória mínima (MIC). Diferentes concentrações foram utilizadas (31.25 to 64000 µg/mL). Os valores de MIC dos OEs de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* sobre o isolado MRSP foram 10667 µg/mL, 32000 µg/mL e 42666 µg/mL, respectivamente. Dentre os OEs, o de *M. piperita* mostrou o menor valor de MIC (5333 µg/mL) e o OE de *M. alternifolia* o maior valor de MIC (37333 µg/mL) sobre o isolado MSSP. Os OEs apresentaram atividade antibacteriana *in vitro* e podem ser considerados como alternativas terapêuticas, porém devem ser realizados mais estudos em condições *in vitro* e *in vivo*.

Palavras-chave: MRSP, piodermite canina, resistência bacteriana, tea tree oil, terpenos

MEIRA, J. **Antibacterial potential of essential oils from *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* against *Staphylococcus pseudintermedius* isolates.** Botucatu, 2023. 51p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Campus de Botucatu, Universidade Estadual Paulista (UNESP).

ABSTRACT

Staphylococcus pseudintermedius is the main opportunistic agent related to canine pyoderma, composing the natural microbiota of hair follicles. It is considered the main cause of the use of antibiotics in small animals. Reports of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) has become frequent in veterinary clinical routine of small animals. Essential oils (EOs) has been studied and become a therapeutic alternative. The *in vitro* antibacterial activity of EOs against MRSP isolates and methicillin-susceptible *S. pseudintermedius* (MSSP) was evaluated. Assays were performed using the broth microdilution assay aiming for minimum inhibitory concentrations (MIC). Different concentrations of the essential oils were placed (31.25 to 64000 µg/mL). The MIC values of the EOs from *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Rosmarinus officinalis* against MRSP isolate were 10667 µg/mL, 32000 µg/mL, and 42666 µg/mL, respectively. Among the oils, *M. piperita* EO showed the lowest MIC value (5333 µg/mL) and EO from *M. alternifolia* showed the highest MIC value (37333 µg/mL) against MSSP. Therefore, the antibacterial effectiveness of the EOs can be considered for further therapeutic use. However, more studies must be conducted *in vitro* and *in vivo* condition.

Keywords: MRSP, canine pyoderma, bacterial resistance, tea tree oil, terpenes

1. INTRODUÇÃO

A piodermite canina é uma infecção bacteriana geralmente associada ao agente oportunista *Staphylococcus pseudintermedius*. Outras espécies do gênero *Staphylococcus* e outros agentes como *Escherichia coli*, *Proteus* spp. e *Pseudomonas* spp., podem ser isolados. É considerada uma das afecções dermatológicas mais recorrentes em animais de companhia, principalmente em cães, e frequentemente se desenvolve de forma secundária a outras dermatopatias que acarretam no comprometimento da barreira cutânea ou imunossupressão do animal (EBANI et al., 2020).

O tratamento dessa afecção é realizado com antibioticoterapia e pode ou não ser eficaz, devido ao aumento de isolados bacterianos resistentes a antibióticos pela utilização frequente e muitas vezes não necessária de antibióticos orais e tópicos em infecções cutâneas. Portanto, há a necessidade da redução do uso de antibióticos e desenvolvimento de novas terapias para o controle microbiano (EBANI et al., 2020). Os óleos essenciais (OEs) tornaram-se uma alternativa para descoberta de novos agentes antibacterianos por possuírem compostos químicos com propriedades antimicrobianas (GALVÃO et al., 2012).

Durante muito tempo, produtos naturais foram utilizados como medicamento para o tratamento de diversas doenças (MERONI et al., 2020) e, atualmente, observa-se um crescimento no interesse em produtos alternativos à base de plantas medicinais e aromáticas. Dentro da rotina veterinária, esses produtos têm se destacado por possuírem menos efeitos adversos, baixo custo, melhor biodegradabilidade e melhor tolerância do paciente (ROSA et al., 2019; YAP et al., 2014). O uso dessas plantas pode fornecer diversos efeitos benéficos no tratamento de dermatopatias por possuírem uma composição complexa com a combinação de vários compostos que atuam dinamicamente entre si e levam a um efeito sinérgico resultando, muitas vezes, em uma melhora clínica efetiva (NIKAM et al., 2012).

Os OEs são definidos como misturas de compostos voláteis obtidos a partir de materiais vegetais (flores, sementes, folhas e/ou raízes), por destilação a vapor ou processos mecânicos. As plantas produzem compostos de metabolismo secundário como forma de adaptação ao meio, podendo ser contra patógenos ou pragas, tolerância a estresses ambientais ou atrativos para polinizadores. Estes compostos compreendem dois grupos popularmente denominados terpenos e compostos aromáticos. Os efeitos biológicos dos OEs podem ser resultantes da molécula de maior porcentagem na composição do óleo ou da sinergia de todas as moléculas presentes, que resultam em um potencial efeito terapêutico (YAP et al., 2014).

Produtos naturais como os OEs, com propriedades antimicrobianas, podem representar uma alternativa adequada no tratamento de infecções, principalmente quando os medicamentos convencionais não se mostrarem eficazes (EBANI et al., 2020). Quando usados de forma isolada, podem não produzir efeitos inibitórios significativos, porém quando usados em conjunto com medicamentos convencionais, podem agir como potenciadores sinérgicos apresentando efeitos terapêuticos e atividade antibacteriana apropriadas, resultando na redução da dose dos antibióticos (GIBBONS et al., 2003; YAP et al., 2014).

A resistência bacteriana é uma preocupação iminente e medidas alternativas são necessárias para o controle. O objetivo deste estudo foi avaliar a eficácia antibacteriana e comparar o potencial terapêutico dos OEs de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* entre os isolados de *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP) e *Staphylococcus pseudintermedius* suscetível à meticilina (MSSP).

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Piodermite canina

Conhecida por ser uma das afecções mais comuns na rotina veterinária, a piodermite canina está entre os principais motivos para a prescrição de antimicrobianos (LOEFFER; LLOYD, 2018). As piodermites são classificadas de acordo com a profundidade da infecção em: piodermite de superfície, superficial e profunda. A piodermite de superfície é limitada ao estrado córneo, não havendo invasão da epiderme e pode ser observado presença de eritema, exsudato e prurido. A piodermite superficial é considerada a mais comum e caracterizada pela presença de pápulas, pústulas e colaretes epidérmicos, podendo haver associação de prurido, dor e inflamação severa. A piodermite profunda é considerada mais grave e sua apresentação clínica é caracterizada por crostas hemáticas, edema, eritema, nódulos e fistulas (LOEFFER; LLOYD, 2018; SUMMERS et al., 2014).

Componente da microbiota da pele de cães, o *S. pseudintermedius* é o principal agente oportunista relacionado à piodermite canina. As piodermites geralmente se desenvolvem de forma secundária como resultado de outras enfermidades, não tratadas, que levam ao comprometimento da barreira cutânea ou imunossupressão do animal. Dermatopatias parasitárias, alérgicas ou endocrinopatias estão comumente associadas à piodermite canina (LOEFFER; LLOYD, 2018).

As formas de tratamento da piodermite canina são: resolução da causa base, terapias tópicas e/ou sistêmicas dependendo do grau da infecção e do quadro geral do animal. No caso de piodermite de superfície e piodermite superficial com lesões focais ou localizadas é indicado

apenas a terapia tópica com uso de shampoo antisséptico. O tratamento para casos de piodermite superficial com lesões extensas ou generalizadas é indicado o uso de shampoo à base de clorexidina ou peróxido de benzoíla de duas a três vezes na primeira semana e depois a semanalmente até a resolução das lesões. Caso não haja resolução somente com a terapia tópica, faz-se necessário iniciar a terapia sistêmica com cefalosporinas de primeira geração, como cefalosporina ou aminopenicilinas como a amoxicilina + clavulanato de potássio. Outros fármacos são indicados como cefovecina, cefadroxila e sulfametoxazol com trimetoprim (HILLIER et al., 2014). Deve-se, de preferência, sempre optar pela realização da análise de sensibilidade *in vitro* para a escolha do melhor antimicrobiano a ser utilizado durante o tratamento do paciente.

2.2. *Staphylococcus* spp.

Staphylococcus são cocos Gram-positivos, com aproximadamente 1µm de diâmetro e tendem a formar agrupamentos semelhantes a cachos de uva. Amplamente distribuídos no mundo todo, existem no mínimo 30 espécies de *Staphylococcus* spp., podendo ser comensais na pele de animais e humanos. *Staphylococcus aureus* é a espécie mais amplamente conhecida dentro do gênero *Staphylococcus* spp., por ser responsável por uma variedade de infecções humanas que incluem piodermites superficiais, osteomielite e sepse (EBANI et al., 2020).

No âmbito da Medicina Veterinária, os agentes *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* e *S. delphini* compreendem juntos o grupo denominado *Staphylococcus intermedius group* (SIG) devido ao alto grau de similaridade genética, sendo a espécie *S. pseudintermedius* a principal espécie patogênica isolada em cães (SASAKI et al., 2007; FITZGERALD, 2009). Com isso, todos os isolados provenientes de cães devem ser denominados *S. pseudintermedius*, a menos que sejam realizados métodos de identificação genética (DEVRIESE et al., 2009). Esse patógeno oportunista, coagulase-positivo, pode ser comensal da pele de cães saudáveis e há relatos de isolamento em indivíduos humanos saudáveis que convivem com animais de estimação (GÓMEZ-SANT et al., 2013).

2.2.1. *Staphylococcus pseudintermedius*

O agente *S. pseudintermedius* está presente em folículos pilosos e pelos e estabelece uma relação de simbiose com o hospedeiro, evitando a colonização e infecção de outros agentes patogênicos (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012; BOTONI et al., 2014). A prevalência desse agente em cães saudáveis pode variar entre 46% e 92% (LATRONICO et al., 2014). A

bactéria também pode ser isolada de locais que apresentam temperaturas mais altas como orofaringe, região perianal, narinas e axilas.

Semelhante à espécie *S. aureus*, *S. pseudintermedius* possui uma variedade de fatores de virulência. Esse agente produz enzimas como a coagulase, termonuclease e proteases, proteínas de superfície, como fator de aglomeração e proteína A e citotoxinas como toxina esfoliativa e enterotoxinas (WLADYKA et al., 2008; TERAUCHI et al., 2003; FUTAGAWA-SAITO et al., 2004; FUTAGAWA-SAITO et al., 2004; FUTAGAWA-SAITO et al., 2006). Além disso, a produção de biofilme foi observada em diversos isolados de *S. pseudintermedius*. Essa estratégia de sobrevivência promove resistência aos mecanismos de defesa do hospedeiro e aumenta a resistência antimicrobiana (GOTZ, 2002; HALL-STOODLEY et al., 2004). No entanto, o conhecimento sobre a patogenicidade do *S. pseudintermedius* ainda é limitado e a maioria dos fatores de virulência ainda não foram caracterizados detalhadamente (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012).

Em decorrência do contato cada vez mais próximo entre humanos e animais de estimação, *S. pseudintermedius* é considerado um importante patógeno com potencial zoonótico. Acredita-se que grupos de pessoas como idosos, médicos veterinários e donos de cães com piodermite recorrente, apresentem maior risco de colonização e/ou infecção por *S. pseudintermedius* (VAN DUIJKEREN et al., 2011; LATRONICO et al., 2014; SOMAYAJI et al., 2016).

2.2.2. *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP)

Isolados de *S. pseudintermedius* eram sensíveis aos antimicrobianos betalactâmicos e atualmente, isolados de MRSP vêm sendo relatados com frequência gerando preocupações na saúde de animais de companhia (NOCERA et al., 2020; LOEFFLER et al., 2007; VAN DUIJKEREN et al., 2011; KASAI et al., 2016). Isolados de MRSP têm mostrado perfis de multirresistência em todo o mundo, incluindo resistência a diversas classes de antibióticos, dentre eles a meticilina que implica também na resistência a outros antimicrobianos da mesma classe, como a penicilina, amoxicilina e a oxacilina (PERRETEN et al., 2010).

Alguns dos mecanismos que resultam na resistência a drogas antibacterianas incluem a produção de enzimas pelas bactérias que destroem ou inativam o princípio ativo da droga, redução da permeabilidade das células bacterianas e desenvolvimento de rotas metabólicas alternativas para substituir aquelas inibidas pela droga. A alteração estrutural do sítio-alvo do

antibiótico e a destruição enzimática do agente são, provavelmente, os mecanismos mais comuns pelos quais a resistência pode ocorrer (QUINN et al., 2005).

Uma bactéria é considerada multirresistente quando apresenta resistência a três ou mais diferentes classes de antimicrobianos (MAGIORAKOS et al., 2012). A resistência desses microrganismos está ligada principalmente a fatores genéticos. *Staphylococcus* resistente à meticilina (MRS) possuem o gene denominado *mecA*, que codifica uma proteína de ligação à penicilina, conhecida como PBP2a, que prejudica a ligação aos betalactâmicos, gerando resistência a todos os antimicrobianos da classe. Esse gene é carregado pelo elemento genético móvel denominado como cassete cromossômico estafilocócico (SCC) (LINDSAY; HOLDEN, 2006; ONUMA et al., 2012; WEESE; VAN DUIJKEREN, 2010).

Existem evidências de que o tratamento repetitivo de casos de piodermite canina recidivante podem levar ao desenvolvimento de isolados MRSP (HUERTA et al., 2011). Essas cepas são frequentemente multirresistentes a classes de antimicrobianos como tetraciclina, cloranfenicol, trimetoprima-sulfametoxazol, aminoglicosídeos, lincosamidas, macrólidos e fluoroquinolonas (VAN DUIJKEREN et al., 2011; PRIYANTHA; GAUNT; RUBIN, 2016)

2.3. Óleos essenciais

A bioquímica aromática e terpênica compreende todas as atividades dos OEs. Há 40 mil anos, as tribos aborígenes na Austrália já usufruíam do potencial de plantas aromáticas para o tratamento de afecções respiratórias ao aspirar a fumaça da queima de eucaliptos ou *tea tree* e no tratamento de queimaduras ou feridas cutâneas, por meio do uso tópico. A Índia é um país que apresenta grande diversidade de plantas aromáticas e é reconhecida por ser uma fonte de especiarias que eram comercializadas no mundo todo por meio da “rota das especiarias” (BAUDOUX, 2018).

Por volta do final do século XVI e início do século XVII, mais de 100 OEs eram utilizados para tratar problemas específicos, porém o surgimento da civilização industrial levou ao esquecimento da fitoterapia. Um mundo invadido pela antibioticoterapia marcou o fim da sua utilização no momento que os microrganismos desenvolveram formas de resistência. É extremamente importante que a comunidade científica assegure a eficácia na luta contra infecções (BAUDOUX, 2018). Conforme Soares e Tavares-Dias (2013), o uso de produtos naturais vem ganhando destaque, pois podem ser fontes promissoras de substâncias bioativas contra parasitas e microrganismos, além de não serem prejudiciais ao meio ambiente e menos agressivos à saúde do paciente.

O OE é um produto obtido de um material vegetal por meio da destilação a vapor ou processos mecânicos. São substâncias voláteis, com impacto olfativo, produzidas por apenas um órgão ou pela planta toda. O volatiloma de uma planta, que corresponde a todas as moléculas voláteis orgânicas e inorgânicas presentes naquele organismo, é originário do seu metabolismo secundário, produzido por diferentes vias biossintéticas de forma constitutiva e/ou após uma indução, como uma estratégia de defesa contra estresses bióticos e abióticos. Essas moléculas podem ter uma função repelente ou uma função atrativa como por exemplo, para a polinização. As moléculas que compõem o volatiloma são armazenadas junto com gotículas de gordura em várias estruturas na matéria vegetal, popularmente chamadas de células secretoras, podendo ser tricomas, bolsas ou ductos glandulares (BAUDOUX, 2018).

A maioria dos OEs são extraídos a partir da destilação a vapor. O processo consiste em fazer circular o vapor d'água por um tanque preenchido com biomassa de plantas aromáticas. Na saída desse tanque e sob baixa pressão, o vapor se torna enriquecido de OE e circula dentro de uma serpentina, local onde se condensa. Na saída do condensador, o vaso separador recolhe a água e o OE. A diferença de densidade permite que se separem facilmente.

O produto extraído pode variar em quantidade, qualidade e na sua composição química, afetando diretamente sua atividade antimicrobiana e sua indicação terapêutica. Alguns fatores estão relacionados como a localização geográfica, clima, solo, idade, ciclo vegetativo e meio de extração das plantas (ANGIONI et al., 2006; ARUMUGAM; SWAMY; SINNI AH, 2016; PICHERSKY; NOEL; DUDAREVA, 2006). Pesquisas científicas que forem realizadas com OEs devem disponibilizar a caracterização biológica e o perfil cromatográfico do OE utilizado (FREIRES et al., 2015). Atualmente, o método padrão para a análise da composição do OE é pela Cromatografia Gasosa (WASEEN; LOW, 2014).

Os OEs obtidos de plantas são naturalmente aromáticos, resultado da mistura de substâncias químicas que pertencem a diferentes famílias químicas, incluindo terpenos, aldeídos, álcoois, cetonas, entre outros (AKHTAR; DEGAGA; AZAM, 2014; DEGENHARDT; KOLLNER; GERSHENZON, 2009). Cerca de 90% dos OEs apresentam os monoterpenos como seus principais compostos (BAKKALI et al., 2008).

Devido à sua natureza lipofílica, os OEs conseguem penetrar facilmente as membranas celulares bacterianas. Sua ação antimicrobiana se dá primeiramente na desestabilização da arquitetura celular, levando ao rompimento da membrana e aumento da permeabilidade, ocasionando o extravasamento de componentes celulares e íons (SAAD; MULLE; LOBSTEIN, 2013; RAUT; KARUPPAVIL, 2014). A ruptura das membranas celulares pelos OEs prejudica diversos processos como conversão energética, processamento de nutrientes, síntese de

macromoléculas estruturais e secreção de reguladores de crescimento (OUSSALAH; CAILLET; LACROIX, 2006). Os OEs podem afetar tanto o envelope externo como o citoplasma da célula (NAZZARO et al., 2013; RAUT; KARUPPAVIL, 2014).

Diferentes estudos investigaram as propriedades antimicrobianas dos OEs e observaram que as bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis do que as Gram-negativas (WINSKA et al., 2019). Dentre os mecanismos que explicam a ação antimicrobiana dos OEs, merece destaque a característica hidrofóbica desses óleos, que resultam na dissolução e/ou aumento da permeabilidade da membrana celular dos microrganismos, resultando no extravasamento do conteúdo celular (JUVEN et al., 1994; KIM et al., 1995; BURT, 2004). O comprometimento dos sistemas enzimáticos bacterianos também pode ser um mecanismo de ação potencial (WENDAKOON & SAKAGUCHI, 1995).

A eficácia da atividade antimicrobiana de OEs tem sido estudada, principalmente na condição *in vitro*, contra uma grande variedade de microrganismos (LÓPEZ et al., 2005). Nos últimos anos, profissionais médicos veterinários introduziram OEs na terapêutica com diferentes propósitos, incluindo o combate a diferentes patógenos. Contudo, são poucos os estudos científicos sobre o uso de OEs na Medicina Veterinária. Alguns estudos relatam resultados positivos da eficácia de OEs *in vitro* contra bactérias isoladas de animais, porém ainda são escassos os estudos *in vivo* contra infecções bacterianas (EBANI et al., 2020).

Em um estudo realizado por Oliveira et al. (2006), as bactérias Gram-positivas (*S. aureus* e *S. epidermis*) se mostraram mais sensíveis às interações entre antibióticos e OEs selecionados para o estudo. Uma explicação, é o fato de as bactérias Gram-positivas possuírem uma parede bacteriana com maior permeabilidade que facilita a penetração de moléculas. Já as Gram-negativas possuem um sistema de barreira constituído pela membrana externa da parede bacteriana formada por fosfolipídios, lipopolissacarídeos e proteínas, que conferem uma maior impermeabilidade aos agentes antibacterianos (LAMBERT, 2002). Entretanto, a eficácia antibacteriana dos OEs difere de patógeno para patógeno.

Um estudo *in vitro* realizado por Meroni et al. (2020) investigou as propriedades antimicrobianas dos OEs de *Melaleuca alternifolia* e *Rosmarinus officinalis* e dois produtos de abelhas sobre cepas de *S. pseudintermedius* isoladas de piodermites caninas. Foi constatado que os OEs testados apresentaram considerável eficácia antibacteriana sobre essa cepa (BOURGUIGNON et al., 2016; DEVRIESE et al., 2009).

Embora a atividade antimicrobiana de um determinado OE tenha sido determinada previamente, deve-se sempre realizar um teste de sensibilidade antibacteriana *in vitro*. A susceptibilidade e a atividade dos OEs podem variar de acordo com a espécie e até entre cepas

de uma mesma espécie de bactéria (PATSILINAKOS et al., 2019). Estudos concluem também que após uma avaliação *in vivo* adequada, esses produtos podem ser um tratamento promissor para combater infecções cutâneas caninas (EBANI et al., 2020).

2.3.1. *Melaleuca alternifolia* - Tea Tree Oil (TTO)

O TTO (*M. alternifolia*) é uma espécie arbórea perene, cujas folhas são o órgão utilizado como matéria prima para produção do OE. As folhas são alternadas, estreitas e lanceoladas. São pontilhadas de glândulas secretoras visíveis que soltam um cheiro cítrico quando maceradas. A planta gosta de solos úmidos e abertos. Cresce principalmente em regiões da Austrália, China e Quênia (BAUDOUX, 2018). Existem evidências de que aborígenes australianos maceravam folhas de *M. alternifolia* para realizar pastas antibacterianas, séculos antes do conhecimento científico da sua propriedade antimicrobiana (SIMÕES et al., 2002).

A composição majoritária do OE de *M. alternifolia* é do álcool monoterpênico terpinen-4-ol, principal responsável pelas propriedades antissépticas e antimicrobianas deste óleo. Swamy, Akhtar e Sinniah (2016) identificaram efeito terapêutico deste óleo sobre cepas de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium avium*, *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pyogenes* e *Streptococcus pneumoniae*. O TTO também possui funções imunomoduladoras e anti-inflamatórias, sendo protagonista quando se trata de aromaterapia (BAUDOUX, 2018).

Em um estudo desenvolvido por Andrade et al. (2014) avaliaram-se 27 diferentes OEs quanto a sua atividade antimicrobiana e observou-se que o OE de TTO inibiu o crescimento de *S. aureus* e *E. coli*. Além disso, estudos demonstraram que TTO e terpinen-4-ol não possuem influência significativa no desenvolvimento de resistência ou susceptibilidade antibacteriana (HAMMER; CARSON; RILEY, 2012).

2.3.2. *Mentha piperita* – Hortelã-pimenta

A hortelã-pimenta (*Mentha piperita*) é um híbrido de *Mentha aquatica* com *Mentha spicata* e foi descoberta em 1696 na Inglaterra. Conhecida também como peppermint, seu cultivo se espalhou pela Europa e Estados Unidos e tem sido amplamente utilizada com intuito terapêutico em países orientais e ocidentais (MAHENDRAN; RAHMAN, 2020). A planta possui preferência por solos não compactados, argilocalcários e ricos em húmus (BAUDOUX, 2018).

Sua composição bioquímica é constituída majoritariamente por mentol (álcool monoterpênico) e mentona (cetona terpênica). Por possuir propriedades terapêuticas

anestésicas, mucolítica, antibacteriana e antifúngica, seu uso terapêutico é indicado para casos de rinites, sinusites, prurido e casos de indigestão (BAUDOUX, 2018).

Em um estudo realizado por Desam et al. (2019) observou-se que o OE de *M. piperita* possui atividade antibacteriana e antifúngica significativa contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e as espécies bacterianas *S. aureus* e *S. pyogenes* demonstraram-se sensíveis ao OE.

Em um estudo realizado por Singh, Shushni e Belkheir (2015) concluiu-se que OE de *M. piperita* possui eficácia no tratamento de infecções bacterianas devido à atividade dos seus componentes químicos principalmente pelo seu composto majoritário, o menthol.

2.3.3. *Rosmarinus officinalis* - Alecrim

R. officinalis cresce em solos secos ou moderadamente úmidos, não tolerando solos anaeróbicos ou encharcados. Seu período de floração ocorre entre maio e junho no clima Mediterrâneo e seu período de frutificação ocorre entre a primavera e verão (RIBEIRO-SANTOS et al., 2015). Essa espécie é cultivada mundialmente e é conhecida pelos seus valores nutricionais e propriedades farmacológicas que a tornaram famosa na medicina tradicional e na produção de cosméticos (BORRÁS-LINARES et al., 2014).

A composição química do OE de alecrim influencia sua atividade biológica. Os principais componentes presentes e que possuem atividade terapêutica são 1,8-cineol, cânfora e α -pineno. O composto 1,8-cineol possui funções antidepressivas, antimicrobianas, antioxidante, relaxante muscular e anti-inflamatórias (BORGES et al., 2019).

Mekonnen et al. (2016), testaram a eficácia antimicrobiana do OE de *R. officinalis* contra vários isolados bacterianos incluindo *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Pseudomonas* spp., *Staphylococcus* spp. e *Escherichia coli*. Em geral cepas de bactérias Gram-positivas demonstram ter maior sensibilidade ao óleo essencial (BOZIN et al., 2007).

3. OBJETIVO

3.1. Objetivo geral

Avaliar se óleos essenciais possuem atividade antibacteriana *in vitro* sobre isolados de *S. pseudintermedius* resistente e suscetível à metilicina, originados de cães com piodermite.

3.2. Objetivos específicos

- Determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos OEs de *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* em isolados de MSSP e MRSP.

Artigo Científico

* Trabalho a ser enviado para a revista Journal of Essential Oil Research.

Antibacterial potential of essential oils from *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* against *Staphylococcus pseudintermedius* isolates

Júlia Meira^a, Ana Flávia Marques Pereira^b, Tatiane Baptista Zapata^b, Gabriele Silva Dias^a, Guilherme de Brito Viana^a, Ary Fernandes Júnior^b, Adriano Sakari Okamoto^a, Luiz Henrique de Araújo Machado^a

^a*Department of Veterinary Clinic, School of Veterinary Medicine and Animal Science, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil*

^b*Department of Chemical and Biological Sciences, Institute of Biosciences of Botucatu, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil*

*correspondence: j.meira@unesp.br; Tel.: +55-48-99159-2201

Antibacterial potential of essential oils from *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* e *Rosmarinus officinalis* against *Staphylococcus pseudintermedius* isolates

ABSTRACT

Staphylococcus pseudintermedius is the main opportunistic agent related to canine pyoderma, composing the natural microbiota of hair follicles. Reports of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) has become frequent in veterinary clinical routine of small animals. Essential oils (EOs) has been studied and become a therapeutic alternative. The *in vitro* antibacterial activity of EOs against MRSP isolates and methicillin-susceptible *S. pseudintermedius* (MSSP) was evaluated. The values of the minimum inhibitory concentration (MIC) of the EOs from *Melaleuca alternifolia*, *Mentha piperita* and *Rosmarinus officinalis* against MRSP isolate were 10667 µg/mL, 32000 µg/mL, and 42666 µg/mL, respectively. Among the oils, *M. piperita* EO showed the lowest MIC value (5333 µg/mL) and EO from *M. alternifolia* showed the highest MIC value (37333 µg/mL) against MSSP. Therefore, the antibacterial effectiveness of the EOs can be considered for further therapeutic use. However, more studies must be conducted *in vitro* and *in vivo* condition.

Keywords: MRSP, canine pyoderma, bacterial resistance, tea tree oil, terpenes

1. Introduction

Canine pyoderma is a bacterial infection usually associated with the opportunistic agent *Staphylococcus pseudintermedius*. It is considered one of the most recurrent dermatological disorders in small animals, especially in dogs, and develops secondary to other dermatopathies. The infections are associated with minor trauma, immunosuppression, parasitic, fungal, or allergic dermatopathies as well endocrine and metabolic disorders (1).

S. pseudintermedius are Gram-positive cocci and are widely distributed throughout the world. At least 30 species of *Staphylococcus* can be commensal on the skin of animals and humans. In the scope of veterinary medicine, the agents *S. pseudintermedius*, *S. intermedius* and *S. delphini* comprise the *Staphylococcus intermedius* group (SIG) due to the high degree of genetic similarity. *S. pseudintermedius* is the main pathogenic specie isolated from dogs (1,2).

As a result of the increasingly close contact between humans and pets, *S. pseudointermedius* is considered an important pathogen with zoonotic potential. Reports indicate an increase of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) isolation in the veterinary routine, creating concerns and occasionally failure of conventional treatments. MRSP isolates have shown multidrug resistance profiles worldwide, including resistance to several classes of antibiotics including methicillin, which also implies resistance to other antimicrobials of the same class, such as penicillin, amoxicillin, and oxacillin (3).

Mechanisms associated with bacterial resistance to antibacterial drugs include the production of enzymes that destroy or inactivate the drug's active principle, reduced permeability of bacterial cells, and the development of alternative metabolic pathways to replace those inhibited by the drug. However, structural alteration of the antibiotic target site and enzymatic destruction of the agent are the most common mechanisms by which resistance can occur (4).

EOs have become an alternative for the discovery of new antibacterial agents since they have chemical compounds with antimicrobial properties and prove to be effective in the treatment of infections (5). In addition, these products stand out for having fewer adverse effects, low cost and better biodegradability, and patient tolerance (6,7).

The effectiveness of the antimicrobial activity of EOs has been studied, mainly in *in vitro* condition. Its activity generates irreversible damage to the cell wall of bacteria, inducing the loss of salts and energy substrates and inhibition of the production and action of bacterial toxins that cause infectious and inflammatory processes (8).

The composition and properties of EOs modify according to the plant species and the influence of environmental factors. For example, tea tree oil is extracted from the *Melaleuca alternifolia* tree species native to regions of Australia, China, and Kenya (8).

Rosmarinus officinalis is a specie of aromatic herb cultivated worldwide, known for its nutritional values and pharmacological properties that made it famous in traditional medicine and cosmetics production (9).

Peppermint EO (*Mentha piperita*) is cultivated in Europe and the United States. It has been widely used as a therapy due to its significant antibacterial and antifungal activity against Gram-positive and Gram-negative bacteria (10, 11).

Therefore, this study aimed to evaluate whether commercial essential oils of tea tree (*M. alternifolia*), rosemary (*R. officinalis*), and peppermint (*M. piperita*) have antibacterial activity against methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) and methicillin-susceptible *S. pseudintermedius* (MSSP) isolates.

2. Materials e Methods

This study was approved by the Ethics Committee for the Use of Animals in Research (CEUA) of the School of Veterinary Medicine and Animal Science of São Paulo State University (UNESP) (no. 0025/2022).

2.1. Essential oils

The EOs from *M. alternifolia*, *M. piperita* e *R. officinalis* were obtained by the company By Samia® Aromatherapy LTDA following Brazilian Norms (NBR) 14725: 2012 and Globally Harmonized System (GHS) standards. The EOs were stored in amber bottles with 10 ml capacity. The chemical composition was obtained by gas chromatography and was provided by the company By Samia® Aromaterapia (Table 1).

Table 1. Density and major compounds obtained according to the analysis certificate by the company By Samia® Aromatherapy.

Essential oils	Density (g/mL)	Major compounds (%)
<i>Melaleuca alternifolia</i>	0.895	terpinen-4-ol (41.1), γ -terpinene (19.5), α -terpinene (9.4), α -terpineol (4.7), p-cimene (3.5), α -pinene (3.4), α -terpinolene (3.2), cineol (2.6), limonene (2.2), aromadendrene (1.9)
<i>Rosmarinus officinalis</i>	0.845	camphor (24.2), α -pinene (21.1), 1,8-cineole (18.8), camphene (9.0), β -pinene (5.2), borneol (3.4), α -terpineol (3.0), limonene (2.7), p-cimene (2.4)
<i>Mentha piperita</i>	0.902	menthol (40.2), menthone (24.4), menthyl acetate (4.7), 1,8-cineole (4.6), menthofuran (4.0), isomenthone (3.9), levomenthol (3.8)

2.2. Isolates origin and characterization

The isolates were provided by Med. Vet. Mariana de Araújo Carvalho, who realized bacterial isolation from dogs with superficial or deep, primary, or recurrent pyoderma, with or without concomitant disease, with no predilection for the breed, sex, or age, routinely treated in different sectors in Botucatu/SP from September 2018 to January 2020. The samples were stored at the Veterinary Clinic department of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics (FMVZ), UNESP, Botucatu/SP.

The technique Matrix Assisted Laser Desorption Ionization-time off Light Mass Spectrometry (MALDI-TOF MS) was used to identify the isolates species. The analysis was conducted at the Milk Quality Research Laboratory at the Department of Animal Nutrition and Production of the Faculty of Veterinary Medicine and Zootechnics of the University of São Paulo, Pirassununga/SP (12).

Detection of the *mecA* gene was performed by the PCR technique using the pair of *mecA1* and *mecA2* primers as described by Murakami et al. (1991). International reference strains were used as positive control (*S. aureus* ATCC 33591) and negative (*S. aureus* ATCC 25923). The samples were analyzed in the Molecular Biology laboratory of the Institute of Biosciences at UNESP (12).

The disk diffusion technique was used to perform the *in vitro* sensitivity profile of the isolates. Sensitivity was determined by halo diameters, divided into three categories: sensitive (S), partially sensitive (PS) and resistant (R) (13,14).

The isolates were stored in Lignières medium after characterization. The samples were transferred into 1.5 ml microtubes containing BHI medium, 30% warmed glycerol, and placed in a storage freezer at -80°C.

One MRSP isolate and one MSSP isolate were selected from the samples bank according to the *in vitro* microbial sensitivity profile (Table 2), which agreed with the MALDI-TOF MS technique. An *S. pseudintermedius* ATCC (49444) strain was used for identification control.

Table 2. *In vitro* microbial susceptibility profile performed by disc diffusion technique of methicillin-resistant *S. pseudintermedius* (MRSP) and methicillin-susceptible *S. pseudintermedius* (MSSP) isolates.

ANTIBIOTICS	MRSP	MSSP
Amicacin	S	S
Amoxicillin + CL ¹	R	S
Ampicillin	R	S
Azithromycin	R	S
Cephalexin	R	S
Cefovecin	R	S
Ceftiofur	R	S
Ceftriaxone	R	PS
Ciprofloxacin	R	S
Clarithromycin	R	S
Clindamycin	R	S
Chloramphenicol	R	S
Doxycycline	R	S
Enrofloxacin	R	S
Erythromycin	R	S
Gentamicin	R	S
Levofloxacin	R	S
Neomycin	R	S
Norfloxacin	R	S
Oxacillin	R	S
Penicillin	R	S
Rifampicin	R	S
Tetracycline	R	S
Tigecycline	R	S

¹CL: Potassium Clavulanate

2.3. Minimum inhibitory concentration (MIC) e minimum bactericidal concentration (MBC)

Assays were performed using the broth microdilution assay aiming for minimum inhibitory concentrations (MIC). Different concentrations of essential oils were placed (31.25 to 64000 µg/mL), adjusted by serial dilution in 96-well sterile microtiter plates containing Mueller Hinton Broth (MHB) + 1% Tween 80, obtaining 100 µl of the product tested in each well. Inocula from overnight cultures at 37°C were standardized in saline solution according to 0.5 McFarland standard (approximately 1.5×10^8 colony forming units (CFU/mL)). 100 µl of the inocula were added to each well, resulting in a final 200 µl and approximately 10^5 CFU/mL per well. Positive controls, consisting of MHB and Amoxicillin + Potassium Clavulanate (250 mg) or Cephalexin (500 mg), were included at 0.25 to 500 µg/mL concentrations. Plates were incubated at 37°C for 24 h. A solution of resazurin redox revealing compound (0.01%) was used to indicate viable bacteria cells. The MIC was considered the lowest concentration of EO for which there was no bacterial growth after the incubation period. Subcultures were performed from the microdilution assay in Petri dishes using brain heart infusion (BHI) + agar and were incubated for 24 h at 37°C to obtain minimum bactericidal concentration (MBC). MBC values were considered the lowest concentration with no colony growth. The assays followed Clinical & Laboratory Standards Institute (CLSI guidelines) (15).

2.4. Statistical analysis

The assay was performed in a completely randomized design with three replications per treatment. Values were transformed using $\ln(x)$ and compared according to Tukey's test ($p < 0.05$) in the statistical program RStudio.

3. Results and discussion

It was possible to observe the *in vitro* antibacterial activity against isolates for all EOs, and antibiotics tested. *M. alternifolia* EO had the lowest MIC (10667 µg/mL) against MRSP isolate between the EOs. The EOs from *M. piperita* (32000 µg/mL) and *R. officinalis* (42667 µg/mL) were statistically equal against MRSP isolate (Table 3). Amoxicillin + CL (31.25 µg/mL) was more effective than Cephalexin (666 µg/mL) against MRSP isolate. Meroni et al. (16) used the EOs from *M. alternifolia* and *R. officinalis* against *S. pseudintermedius* isolated from canine pyoderma, and the antibacterial efficacy was observed. The antibacterial activity of the EO from *M. alternifolia* was also observed against the agents *S. aureus* and *E. coli* (17).

The MSSP isolate was more sensitive to the positive control Amoxicillin + CL (0.33 $\mu\text{g/mL}$). Among the EOs, *M. piperita* EO showed the lowest MIC value, 5333 $\mu\text{g/mL}$ (Figure 1), and the EO from *M. alternifolia* (37333 $\mu\text{g/mL}$) had the highest MIC against MSSP isolate. There was no statistically significant difference between the EOs of *M. piperita* and *R. officinalis* against MSSP isolate (Table 3). The *M. piperita* EO is effective in treating bacterial infections due to the activity of its chemical components, mainly menthol, its major compound (18). Desam et al. (11) observed that *S. aureus* and *S. pyogenes* species were also more sensitive to *M. piperita* EO.

Table 3. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC) in $\mu\text{g/mL}$ of the essential oils from *M.alternifolia*, *R.officinalis*, *M.piperita* and the antibiotics Amoxicillin + Potassium Clavulanate and Cephalexin.

	<i>M. alternifolia</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>M. piperita</i>	Amoxicillin + CL	Cephalexin
Strains	MIC	MIC	MIC	MIC	MIC
MRSP	10667 ^{1,2} Ac	42667 Bd	32000 Bd	31.25 Ca	666 Bb
MSSP	37333 Ad	16000 Acd	5333 Ac	0.33 Aa	1.33 Ab
<i>S.pseudintermedius</i> ATCC (49444)	21333 Ac	64000 Bd	32000 Bcd	1.33 Ba	3.33 Ab

¹Means within a column followed by the same upper case letters are not significantly different from each other using Tukey test ($p < 0.05$).

²Means within a row followed by the same lower case letters are not significantly different from each other using Tukey test ($p < 0.05$).

The major compounds of *R. officinalis* EO were camphor, α -pinene and 1,8-cineole (Table 1), considered the main ones with therapeutic activity (19). Gram-positive bacteria have been shown to have greater sensitivity to the essential oil (20). In this study, we observed that the EO from *R. officinalis* had the highest MIC value against MRSP isolate and *S. pseudintermedius* ATCC (49444) strain (Table 3). In the literature, the major components are the most studied and generally reflect on the biological and biophysical characteristics of EOs. The effect of these isolated compounds modify according to their concentration when tested alone or synergistically with other compounds (26).

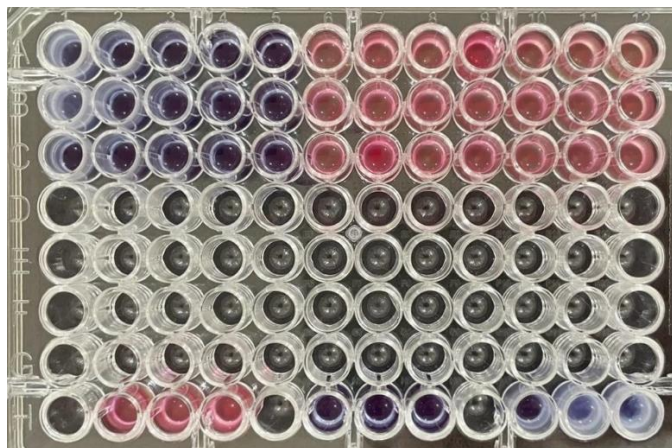


Figure 1: Microtiter plate used in the broth microdilution assay against MSSP isolate demonstrating the MIC value *M. piperita* EO (5333 $\mu\text{g}/\text{mL}$) after adding resazurin (0.01%). Purple wells indicate concentrations without bacterial growth, and pink wells with bacterial growth.

The MBC values of the EOs were higher when compared to the MIC. In Table 4, we can see that Amoxicillin + CL showed the lowest MBC value ($< 0.25 \mu\text{g}/\text{mL}$) against MSSP isolate, followed by Cephalexin (2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Among the EOs, *M. alternifolia* EO showed the lowest MBC value (16000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) against the MRSP isolate, and the *M. piperita* EO showed the lowest MBC (8000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) against the MSSP isolate. Furthermore, the EO from *R. officinalis* showed a value higher than 64000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ against the *S. pseudintermedius* ATCC (49444) strain (Table 4).

Table 4. Minimum bactericidal concentration (MBC) in $\mu\text{g}/\text{mL}$ of the essential oils from *M. alternifolia*, *R. officinalis*, *M. piperita* and the antibiotics Amoxicillin + Potassium Clavulanate and Cephalexin.

	<i>M.alternifolia</i>	<i>R.officinalis</i>	<i>M.piperita</i>	Amoxicillin + CL	Cephalexin
Strains	MBC	MBC	MBC	MBC	MBC
MRSP	16000	64000	32000	62.50	>500
MSSP	64000	16000	8000	<0.25	2.0
<i>S.pseudintermedius</i> ATCC (49444)	64000	>64000	64000	2.0	4.0

Gram-positive bacteria, such as those of the *Staphylococcus* genus, are more susceptible to EOs than Gram-negative ones (21). One explanation is that Gram-positive bacteria have a cell wall with greater permeability, which facilitates the penetration of the molecule. Otherwise,

Gram-negative bacteria have a barrier system consisting of the outer membrane of the bacterial wall formed by phospholipids, lipopolysaccharides, and proteins that provide greater impermeability to antibacterial agents (22).

EOs can easily penetrate bacterial cell membranes due to their lipophilic nature. Therefore, its antimicrobial action primarily destabilizes the cellular architecture, disrupting the membrane and increasing permeability, causing the leakage of cellular components and ions (23,24). The disruption of cell membranes by EOs impairs several processes, such as energy conversion, nutrient processing, synthesis of structural macromolecules, and secretion of growth regulators (25).

There is urgency in developing new substances with antibacterial properties against MDR bacteria. However, even with the promising *in vitro* results of other studies, there are difficulties to be solved that allow the use of EOs *in vivo* as stability, selectivity, and bioavailability of these natural products. Moreover, ideal proportions and dosages must be optimized for greater effectiveness and decreased toxicity (6).

In recent years, essential oils have acquired importance for their antibacterial potential. The agent's susceptibility and the EOs' activity may vary according to the species or strain of the target bacteria (27). However, studies evaluating the antibacterial efficacy of EOs against *S. pseudointermedius* isolates still need to be made available.

In this study, we observed that the values obtained for MIC and MBC demonstrate that essential oils have an antibacterial effect against *S. pseudointermedius* isolates. Nevertheless, more studies *in vitro* and *in vivo* conditions evaluating different concentrations, types, and compounds of EOs, must be conducted. It was concluded that the essential oils from *M. alternifolia*, *M. piperita* and *R. officinalis* have antibacterial activity against MRSP and MSSP isolates and may be promising sources of alternative or complementary therapies in the treatment of canine pyoderma.

References

1. T. Sasaki, K. Kikuchi, Y. Tanaka, N. Takahashi, S. and Kamata, K. Hiramatsu, Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal Of Clinical Microbiology*, 45, 2770–2778 (2007).
2. J.R. Fitzgerald, The *Staphylococcus intermedius* group of bacterial pathogens: species re-classification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance. *Veterinary Dermatology*, 20, 490–495 (2009).
3. V. Perreten, K. Kadlec, S. Schwarz, U. Gronlund Andersson, M. Finn, C. Greko, A. Moodley, S.A. Kania, L.A. Frank, D.A. Bemis, A. Franco, M. Iurescia, A. Battisti, B. Duim, J. A. Wagenaar, E. Van Duijkeren, J. S. Weese, J. R. Fitzgerald, A. Rossano, and L. Guardabassi, Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: an international multicentre study. *Journal Of Antimicrobial Chemotherapy*, 65, 1145–1154 (2010).
4. P. J. Quinn, B. K. Markey, M. E. Carter, W. J. Donnelly and F. C. Leonard, *Microbiologia Veterinária E Doenças Infecciosas*. Porto Alegre, Editora Artmed (2005).
5. V. V. Ebani, F. Bertelloni, B. Najar, S. Nardoni, L. Pistelli and F. Mancianti, Antimicrobial activity of essential oils against *Staphylococcus* and *Malassezia* strains isolated from canine dermatitis. *Microorganisms*, 8, 252 (2020).
6. P. S. X. Yap, B. C. Yiap, H. C. Ping and S. H. E. Lim, Essential oils, a new horizon in combating bacterial antibiotic resistance. *The Open Microbiology Journal*, 8, 06-14 (2014).
7. D. Rosa, S. Cristiana, P. Gabriella and B. A. Rita, Antifungal activity of different essential oils against *Malassezia* pathogenic species. *Journal of Ethnopharmacology*, 249 (2019).
8. D. Baudoux, *O Grande Manual Da Aromaterapia De Dominique Baudoux*, 1st edn. Belo Horizonte, Editora Laszlo (2018).
9. I. Borrás-Linares, Z. Stojanovic, R. Quirantes-Piné, D. Arráez-Román, J. Svarc-Gajić, A. Fernández-Gutiérrez, A. Segura-Carretero, I. Borrás-Linares, Z. Stojanović, R. Quirantes-Piné, D. Arráez-Román, J. Švarc-Gajić, A. Fernández-Gutiérrez and A. Segura-Carretero, *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 15, 20585–20606 (2014).

10. G. Mahendran and L. U. Rahman, ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on peppermint (*Mentha × Piperita* L.) a review. *Phytotherapy Research*, 34, 2088-2139 (2020).
11. N. R. Desam, A. J. Al-Rajab, M. Sharma, M. M. Mylabathula, R. R. Gowkanapalli and M. Albratty, Chemical constituents, in vitro antibacterial and antifungal activity of *Mentha × Piperita* L. (Peppermint) essential oils. *Journal Of King Saud University-Science*, 31, 528-533 (2019).
12. M. A. Carvalho, Detecção do gene *mecA* e perfil de resistência antimicrobiana em isolados de piодermites caninas no município de Botucatu (Brasil) (2020).
13. L. M. J. Mimica, C. M. F. Mendes and I. M. Mimica, *Controle Laboratorial Do Tratamento Das Infecções Bacterianas*. 4th edn. São Paulo, Editora Atheneu (2005).
14. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI), Performance standards for antimicrobial susceptibility testing, CLSI Supplement M100, 29th edn. (2019).
15. Clinical And Laboratory Standards Institute (CLSI), Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. CLSI Standard, 11th edn. (2018).
16. G. Meroni, E. Cardin, C. Rendina, V. R. Herrera Millar, F. J. F. Soares and P. A. Martino, In vitro efficacy of essential oils from *Melaleuca alternifolia* and *Rosmarinus officinalis*, Manuka honey-based gel, and propolis as antibacterial agents against canine *Staphylococcus pseudintermedius* strains. *Antibiotics*, 9, 344 (2020).
17. B. F. M. T. Andrade, L. N. Barbosa, I. S. Probst and A. F. Junior, Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, 26, 34–40 (2014).
18. R. Singh, M. A. Shushni and A. Belkheir, Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*, 8, 322-328 (2015).
19. R. S. Borges, B. L. S. Ortiz, A. C. M. Pereira, H. Keita and J. C. T. Carvalho, *Rosmarinus officinalis* essential oil: a review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal Of Ethnopharmacology*, 229, 29-45 (2019).
20. B. Bozin, N. Mimica-Dukic, I. Samojlik and E. Jovin, Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 55, 7879-7885 (2007).
21. K. Wińska, W. Mączka, J. Łyczko, M. Grabarczyk, A. Czubaszek and A. Szumny, Essential oils as antimicrobial agents - myth or real alternative? *Molecules*, 24, 2130 (2019).

22. P. A. Lambert, Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, 92, 46-54 (2002).
23. N. Y. Saad, C. D. Muller and A. Lobstein, Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, 28, 269– 279 (2013).
24. J. S. Raut and S. M. A. Karuppayil, Status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, 62, 250–264 (2014).
25. M. Oussalah, S. Caillet and M. Lacroix, Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal Of Food Protection*, 69, 1046–1055 (2006).
26. E. Ipek, H. Zeytinoglu, S. Okay, B. A. Tuylu, M. Kurkcuoglu and K. Husnu Can Baser, Genotoxicity and antigenotoxicity of origanum oil and carvacrol evaluated by ames salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, 93, 551–556 (2005).
27. A. Patsilnakos, M. Artini, R. Papa, M. Sabatino, M. Bozovic, S. Garzoli, G. Vrenna, R. Buzzi, S. Manfredini, L. Selan and R. Ragno, Machine learning analyses on data including essential oil chemical composition and in vitro experimental antibiofilm activities against staphylococcus species. *Molecules*, 24, 890 (2019).

Discussão geral

Para a determinação da CIM dos OEs foram realizados ensaios de acordo com a metodologia de microdiluição em caldo. Foram selecionados um isolado MRSP e um isolado MSSP, além de um controle de identificação *S.pseudintermedius* ATCC (49444). Utilizou-se diferentes concentrações dos óleos essenciais (31.25 a 64000 µg/mL) e avaliou-se as microplacas após 24h. As concentrações dos controles positivos variaram de (0.25 a 500 µg/mL). Obtemos o MIC para todos os OEs e antibióticos testados de modo que foi possível observar a atividade antibacteriana *in vitro* sobre os isolados utilizados.

O agente *S.pseudintermedius* é conhecido por atuar como patógeno oportunista, causam infecções piogênicas e representam uma grande preocupação na Medicina Veterinária (EBANI et al., 2020; QUINN et al., 2005). As infecções oportunistas estão associadas a pequenos traumas, imunossupressão, dermatopatias parasitárias, fúngicas ou alérgicas e a distúrbios endócrinos e metabólicos que podem predispor ao desenvolvimento da infecção (EBANI et al., 2020). Infecções causadas por essa bactéria geralmente não são transmissíveis pelo contato direto entre cães doentes e saudáveis, porém informações sobre o papel desempenhado pelo hospedeiro na infecção por *S.pseudintermedius* ainda são escassas (BANNOEHR; GUARDABASSI, 2012).

Em um estudo realizado por Haenni et al. (2014) 16.9% dos isolados de *S.pseudintemedius* em cães no ano de 2010 eram MRSP. Outro estudo observou que 43.1% dos casos de piodermite canina estavam associados ao isolamento de MRSP (BRYAN et al., 2012). Ainda, Hensel, Zabel e Hense (2016) observaram que o uso de cefalexina e cefpodoxima está relacionado com o aumento de cepas MRSP.

Deve-se ter em mente que os OEs são misturas complexas de moléculas. Há a reflexão se os seus efeitos biológicos e terapêuticos são resultado do sinergismo dessas moléculas ou se apenas o seu composto majoritário possui função terapêutica. Alguns autores afirmam que a sinergia dos componentes majoritários em combinação com as outras moléculas, em menores concentrações, potencialize função terapêutica dos OEs, porém são necessárias mais pesquisas que aprofundem o que realmente resulta no efeito biológico dos OEs (BAKKALI et al., 2008). Na literatura, os componentes majoritários acabam sendo os mais estudados e, geralmente, refletem nas características biológicas e biofísicas dos OEs. O efeito desses compostos isolados, variam de acordo com sua concentração quando testados isoladamente ou de forma sinérgica com os outros compostos (IPEK et al., 2005).

Na sua ação antibacteriana, os OEs geram lesões irreversíveis na parede celular de bactérias induzindo a perda de matéria, sais e substratos de energia, lise celular e inibição da produção e a ação de toxinas bacterianas que causam os processos infecciosos e inflamatórios (BAUDOUX, 2018). Também foi demonstrado atividade anti-inflamatória dos OEs contribuindo para a melhora tegumentar (PISTELLI et al., 2012).

Mesmo com os resultados promissores obtidos em ensaios *in vitro*, ainda existem dificuldades a serem resolvidas como a estabilidade da molécula, seletividade e biodisponibilidade desses produtos naturais e, além disso, deve-se determinar a proporção e dosagens ideais para maior eficácia e diminuição da toxicidade (YAP et al., 2014). Esses parâmetros críticos devem ser estabelecidos em estudos científicos mais precisos para caracterizar de forma completa suas propriedades e efeitos que alguns OEs podem ter após a sua administração (YAP et al., 2014; MERONI et al., 2020). Os resultados dos estudos sobre a atividade antibacteriana dos óleos essenciais não são facilmente comparados pois não existe um padrão da metodologia para avaliação da atividade inibitória tão bem estabelecida quanto os antibióticos (COUTINHO et al., 2010; YAP et al., 2014; BISMARCK et al., 2020).

A susceptibilidade e a atividade dos OEs podem variar de acordo com a espécie e até entre cepas de uma mesma espécie de bactéria (PATSIKILINAKOS et al., 2019). Existe a necessidade de desenvolver novas substâncias com propriedades antimicrobianas na luta contra as bactérias MDR e o uso de OEs podem ser uma alternativa terapêutica promissora em cães com dermatopatias, como a piodermite (PEREIRA et al., 2004; HEMAISWARYA et al., 2008; NOCERA et al., 2020). Após uma avaliação *in vitro* e *in vivo* adequadas, esses produtos podem ser considerados para um tratamento promissor no combater de infecções cutâneas caninas (EBANI et al., 2020).

Conclusões finais

Ainda são escassos os estudos avaliando a eficácia antibacteriana de OEs sobre isolados de *S. pseudointermedius*. Nesse estudo observamos que os valores obtidos de MIC e MBC demonstram que os óleos essenciais possuem efeito antibacteriano sobre os isolados, porém há a necessidade de estudos que comprovem os seus efeitos em condições *in vivo*. Concluiu-se que os óleos essenciais de *M. alternifolia*, *M. piperita* e *R. officinalis* possuem atividade antibacteriana sobre os isolados MRSP e MSSP e podem ser fontes promissoras de terapias alternativas ou complementares no tratamento da piodermite canina. Contudo, são necessários mais estudos *in vitro* e *in vivo* avaliando diferentes concentrações, tipos e compostos de OEs além da possível sinergia entre produtos naturais e antimicrobianos convencionais.

REFERÊNCIAS

- AKHTAR, M. S.; DEGAGA, B.; AZAM, T. Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. *Biological Sciences and Pharmaceutical Research*, v. 2, p. 1–7, 2014.
- ANGIONI, A.; BARRA, A.; CORONEO, V.; DESSI, S.; CABRAS, P. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 54, p. 4364–4370, 2006.
- ANDRADE, B. F. M. T.; BARBOSA, L. N.; PROBST, I. S.; JUNIOR, A. F. Antimicrobial activity of essential oils. *Journal of Essential Oil Research*, v. 26, p. 34–40, 2014.
- BANNOEHR, J.; GUARDABASSI, L. *Staphylococcus pseudintermedius* in the dog: taxonomy, diagnostics, ecology, epidemiology and pathogenicity. *Veterinary dermatology*, v. 23, p. 253-e52, 2012.
- ARUMUGAM, G.; SWAMY, M. K.; SINNIAH, U. R. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: botanical, phytochemical, pharmacological and nutritional significance. *Molecules*, v. 21, p. 369, 2016.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils—a review. *Food and Chemical Toxicology*, v. 46, p. 446–475, 2008.
- BAUDOUX, D. *O Grande Manual da Aromaterapia de Dominique Baudoux*, 1 Ed., Belo Horizonte, Editora Laszlo, 2018.
- BORGES, R. S.; ORTIZ, B. L. S.; PEREIRA, A. C. M.; KEITA, H.; CARVALHO, J. C. T. *Rosmarinus officinalis* essential oil: A review of its phytochemistry, anti-inflammatory activity, and mechanisms of action involved. *Journal of ethnopharmacology*, v. 229, p. 29-45, 2019.
- BORRÁS-LINARES, I.; STOJANOVIC, Z.; QUIRANTES-PINÉ, R.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; ŠVARC-GAJIĆ, J.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A.; BORRÁS-LINARES, I.; STOJANOVIĆ, Z.; QUIRANTES-PINÉ, R.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; ŠVARC-GAJIĆ, J.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; SEGURA-CARRETERO, A. *Rosmarinus officinalis* leaves as a natural source of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, v. 15, p. 20585–20606, 2014.
- BOURGUIGNON, E.; VIÇOSA, G. N.; CORSINI, C. M. M.; MOREIRA, M. A. S.; NERO, L. A.; CONCEIÇÃO, L. G. Description of Methicillin-Resistant *Staphylococcus*

Pseudintermedius from Canine Pyoderma in Minas Gerais State, Brazil. *Arquivos Brasileiros De Medicina Veterinária e Zootecnia*, v. 68, n. 2, p. 299–306, 2016.

BOTONI, L. S.; FILHO, N. P. R.; SCHERER, C. B.; BRAGA, L.; LEME, F. O. P.; BICALHO, A. P. C. V. Piodermite superficial canina por *Staphylococcus pseudintermedius* resistente à meticilina (MRSP). *Medvep Dermato - Revista de Educação Continuada em Dermatologia e Alergologia Veterinária*, v. 3, p. 270-277, 2014.

BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; JOVIN, E. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. *Journal of agricultural and food chemistry*, v. 55, 7879-7885, 2007.

BRYAN, J., FRANK, L. A., ROHRBACH, B. W., BURGETTE, L. J., CAIN, C. L., BEMIS, D. A. Treatment outcome of dogs with meticillin-resistant and meticillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* pyoderma. *Veterinary Dermatology*, v. 23, p. 361-368, 2012.

BURT, S. Essential Oils: Their Antibacterial Properties and Potential Applications in Foods – A Review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, p. 223–253, 2004.

CARVALHO, M. A. detecção do gene *mecA* e perfil de resistência 54 antimicrobiana em isolados de piodermite caninas no município de Botucatu (Brasil). Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, Universidade Estadual de São Paulo “Júlio de Mesquita Filho”. Botucatu, p. 60. 2020.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing, CLSI Supplement M100, 29 Ed., 2019.

DEGENHARDT, J.; KOLLNER, T. G.; GERSHENZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*, v. 70, p. 1621–1637, 2009.

DESAM, N. R.; AL-RAJAB, A. J.; SHARMA, M.; MYLABATHULA, M. M.; GOWKANAPALLI, R. R.; ALBRATTY, M. Chemical constituents, in vitro antibacterial and antifungal activity of *Mentha* × *Piperita* L. (peppermint) essential oils. *Journal of King Saud University-Science*, v. 31, 528-533, 2019.

DEVRIESE, L. A.; HERMANS, K.; BAELE, M. HAESEBROUCK, F. *Staphylococcus Pseudintermedius* Versus *Staphylococcus Intermedius*. *Veterinary Microbiology*, v. 133, p. 206-207, 2009.

EBANI, V. V.; BERTELLONI, F.; NAJAR, B.; NARDONI, S.; PISTELLI, L.; MANCIANTI, F. Antimicrobial Activity of Essential Oils Against Staphylococcus and Malassezia Strains Isolated from Canine Dermatitis. *Microorganisms*, v. 8, p. 252, 2020.

FITZGERALD, J.R. The Staphylococcus intermedius group of bacterial pathogens: species reclassification, pathogenesis and the emergence of meticillin resistance. *Veterinary Dermatology*, v. 20, p. 490–495, 2009.

FREIRES, I. A.; DENNY, C.; BENSO, B.; DE ALENCAR, S. M.; ROSALEN, P. L. Antibacterial activity of essential oils and their isolated constituents against cariogenic bacteria: a systematic review. *Molecules*, v. 20, p. 7329–7358, 2015.

FUTAGAWA-SAITO, K.; SUZUKI, M.; OHSAWA, M.; OHSHIMA, S.; SAKURAI, N.; BA-THEIN, W.; FUKUYASU, T. Identification and prevalence of an enterotoxin-related gene, se-int, in Staphylococcus intermedius isolates from dogs and pigeons. *Journal of Applied Microbiology*, v. 96, p. 1361–1366, 2004.

FUTAGAWA-SAITO, K.; SUGIYAMA, T.; KARUBE, S.; SAKURAI, N.; BA-THEIN, W.; FUKUYASU, T. Prevalence and characterization of leukotoxin-producing Staphylococcus intermedius in isolates from dogs and pigeons. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 42, p. 5324–5326, 2004.

FUTAGAWA-SAITO, K.; BA-THEIN, W.; SAKURAI, N.; FUKUYASU, T. Prevalence of virulence factors in Staphylococcus intermedius isolates from dogs and pigeons. *BMC Veterinary Research*, v. 2, 2006.

GALVÃO, L. C.; FURLETTI, V. F.; BERSAN, S. M.; DA CUNHA, M. G.; RUIZ, A. L.; DE CARVALHO, J. E.; SARTORATTO, A.; REHDER, V. L.; FIGUEIRA, G. M.; TEIXEIRA DUARTE, M. C.; IKEGAKI, M.; DE ALENCAR, S. M., ROSALEN, P. L. Antimicrobial activity of essential oils against Streptococcus mutans and their antiproliferative effects. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2012, 2012.

GIBBONS, S.; OLUWATUYI, M.; VEITCH, N. C.; GRAY A. I. Bacterial Resistance Modifying Agents from Lycopus Europaeus. *Phytochemistry*, v. 62, p. 83-87, 2003.

GÓMEZ-SANZ, E.; TORRES, C.; CEBALLOS, S.; LOZANO, C.; ZARAZAGA, M. Clonal dynamics of nasal Staphylococcus aureus and Staphylococcus pseudintermedius in dog-owning household members. *Plos One*, v. 8, 2013.

GOTZ, F. Staphylococcus and biofilms. *Molecular Microbiology*, v. 43, p. 1367-1378, 2002.

HAENNI, M.; ALVES DE MORALES, N.; CHATRE, P.; MEDAILLE, C.; MOODLEY, A.; MADEC, J. Characterization of clinical canine meticillin-resistant and meticillin-susceptible *Staphylococcus pseudintermedius* in France. *Journal of Global Antimicrobial Resistance*, v. 2, p. 119–123, 2014.

HALL-STOODNEY, L; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to the infectious diseases. *Nature reviews microbiology*, v. 2, p. 95-108, 2004.

HAMMER, K. A.; CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Effects of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) essential oil and the major monoterpene component terpinen-4-ol on the development of single- and multistep antibiotic resistance and antimicrobial susceptibility. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 56, p. 909–915, 2012.

HEMAISWARYA, S.; KRUTHIVENTI, A. K.; DOBLE, M. Synergism between natural products and antibiotics against infectious diseases. *Phytomedicine*, v. 15, p. 639–652, 2008.

HENSEL, N., ZABEL, S., HENSEL, P. Prior antibacterial drug exposure in dogs with meticillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) pyoderma. *Veterinary Dermatology*, v. 27, p. 72-78, 2016.

HILLIER, A.; LLOYD, D. H.; WEESE, J. S.; BLONDEAU, J. M.; BOOTHE, D.; BREITSCHWERDT, E.; GUARDABASSI, L.; PAPICH, M. G.; RANKIN, S.; TURNIDGE, J. D.; SYKES, J. E. Guidelines for the diagnosis and antimicrobial therapy of canine superficial bacterial folliculitis (Antimicrobial Guidelines Working Group of the International Society for Companion Animal Infectious Diseases). *Veterinary dermatology*, v. 25, p. 163-e43, 2014.

HUERTA, B.; MALDONADO, A.; GINEL, P.J.; TARRADAS, C.; GOMEZ-GASCON, L.; ASTORGA, R. J.; LUQUE, I. Risk factors associated with the antimicrobial resistance of staphylococci in canine pyoderma. *Veterinary Microbiology*, v. 150, p. 302–308, 2011.

IPEK, E.; ZEYTINOGLU, H.; OKAY, S.; TUYLU, B. A.; KURKCUOGLU, M.; HUSNU CAN BASER, K. Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum* oil and carvacrol evaluated by Ames Salmonella/microsomal test. *Food Chemistry*, v. 93, p. 551–556, 2005.

JUVEN, J.; KANNER, J.; SCHVED, F.; WEISSLOWICZ, H. Factors that Interact with Antimicrobial Action of Thyme Essential Oil and its Active Constituents. *Journal of Applied Microbiology*, v. 76, p. 626–631, 1994.

KASAI, T.; SAEGUSA, S.; SHIRAI, M.; MURAKAMI, M.; KATO, Y. New categories designated as healthcare-associated and community-associated methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in dogs. *Microbiology and Immunology*, v. 60, p. 540–551, 2016.

KIM, J.; MARSHALL, M.; WEI, C. Antimicrobial Activity of Some Essential Oils Components Against Five Foodborne Pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 43, p. 2839–2845, 1995.

LAMBERT, P. A. Cellular impermeability and uptake of biocides and antibiotics in Gram-positive bacteria and mycobacteria. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement*, v. 92, p. 46-54, 2002.

LATRONICO, F.; MOODLEY, A.; NIELSEN, S. S.; GUARDABASSI, L. Enhanced adherence of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* sequence type 71 to canine and human corneocytes. *Veterinary research*, v. 45, p. 70, 2014.

LINDSAY, J. A.; HOLDEN, M. T. Understanding the rise of the superbug: investigation of the evolution and genomic variation of *Staphylococcus aureus*. *Functional & Integrative Genomics*, v. 6, p. 186-201, 2006.

LOEFFLER, A.; LINEK, M.; MOODLEY, A.; GUARDABASSI, L.; SUNG, J.M.L.; WINKLER, M.; WEISS, R.; LLOYD, D.H. First report of multiresistant, *mecA*-positive *Staphylococcus intermedius* in Europe: 12 cases from a veterinary dermatology referral clinic in Germany. *Veterinary Dermatology*, v. 18, p. 412–421, 2007.

LOEFFLER, A.; LLOYD, D. H. What has changed in canine pyoderma? A narrative review. *The Veterinary 1809 Journal*, v. 235, p. 73-82, 2018.

LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; BATLLE, R.; NERÍN, C. Solid and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: Susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, p. 6939–6946, 2005.

MAGIORAKOS, A. P.; SRINIVASAN, A.; CAREY, R. B.; CARMELI, Y.; FALAGAS, M. E.; GISKE, C. G.; HARBARTH, S.; HINDLER, J. F.;KAHLMETER, G.; LILJEQUIST, B. O.; PATERSON, D. L.; RICE, L. B.; STELLING, J.; STRUELENS, M. J.; VATOPOULOS, A.; WEBER, J. T.; MONNET, D. I. Multidrug-resistant, extensively drug-resistant and pandrug resistant bacteria: an international expert proposal for interim standard definitions for acquired resistance. *Clinical microbiology and infection*, v. 18, p. 268-281, 2012.

- MAHENDRAN, G.; RAHMAN, L. U. Ethnomedicinal, phytochemical and pharmacological updates on Peppermint (*Mentha × piperita* L.)-A review. *Phytotherapy Research*, v. 34, p. 2088-2139, 2020.
- MEKONNEN, A.; YITAYEW, B.; TESEMA, A.; TADDESE, S. In vitro antimicrobial activity of essential oil of *Thymus schimperi*, *Matricaria chamomilla*, *Eucalyptus globulus*, and *Rosmarinus officinalis*. *International journal of microbiology*, v. 2016, 2016.
- MERONI, G.; CARDIN, E.; RENDINA, C.; HERRERA MILLAR V. R.; SOARES, F. J. F.; MARTINO, P. A. In Vitro Efficacy of Essential Oils from *Melaleuca Alternifolia* and *Rosmarinus Officinalis*, Manuka Honey-Based Gel, and Propolis as Antibacterial Agents Against Canine *Staphylococcus Pseudintermedius* Strains. *Antibiotics*, v. 9, p. 344, 2020.
- MIMICA, L. M. J.; MENDES, C. M. F.; MIMICA, I. M. Controle laboratorial do tratamento das infecções bacterianas. 4 Ed., São Paulo, Editora Atheneu, 2005.
- MURAKAMI, K.; MINAMIDE, W.; WADA, K.; NAKAMURA, E.; TERAOKA, H.; WATANABE, S. Identification of methicillin-resistant strains of staphylococci by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 29, p. 2240-2244, 1991.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; DE MARTINO, L.; COPPOLA, R.; DE FEO, V. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. *Pharmaceuticals*, v. 6, p. 1451–1474, 2013.
- NIKAM, P. H. KAREPARAMBAN, J.; JADHAV, A.; KADAM, V. Future Trends in Standardization of Herbal Drugs. *Journal of Applied Pharmaceutical Science*, v. 2, p. 38-44, 2012.
- NOCERA, F. P.; MANCINI, S.; NAJAR, B.; BERTELLONI, F.; PISTELLI, L.; DE FILIPPIS, A.; FIORITO, F.; DE MARTINO, L.; FRATINI, F. Antimicrobial activity of some essential oils against methicillin-susceptible and methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*-associated pyoderma in dogs. *Animals*, v. 10, p. 1782, 2020.
- OLIVEIRA, R. A. G; LIMA, E. O.; VIEIRA, W. L.; FREIRE, K. R. L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I. O.; SOUZA, E. L.; TOLEDO, M. S.; SILVA FILHO, R. N. Estudo da interferência de OEs sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 16, p. 77-82, 2006.
- ONUMA, K.; TANABE, T.; SATO, H. Antimicrobial resistance of *Staphylococcus pseudintermedius* isolates from healthy dogs and dogs affected with pyoderma in Japan. *Veterinary dermatology*, v. 23, p. 17, 2012.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*, v. 69, p. 1046–1055, 2006.

PATSILINAKOS, A.; ARTINI, M.; PAPA, R.; SABATINO, M.; BOZOVIC, M.; GARZOLI, S.; VRENNA, G.; BUZZI, R.; MANFREDINI S.; SELAN, L.; RAGNO, R. Machine Learning Analyses on Data Including Essential Oil Chemical Composition and in vitro Experimental Antibiofilm Activities Against *Staphylococcus* species. *Molecules*, v. 24, p. 890, 2019.

PEREIRA, R. S.; SUMITA, T. C.; FURLAN, M. R.; JORGE, A. O. C.; UENO, M. Atividade antibacteriana de óleos essenciais em cepas isoladas de infecção urinária. *Revista de Saúde Pública*, v. 2, p. 326–328, 2004.

PERRETTEN, V.; KADLEC, K.; SCHWARZ, S.; GRONLUND ANDERSSON, U.; FINN, M.; GREKO, C.; MOODLEY, A.; KANIA, S.A.; FRANK, L.A.; BEMIS, D.A.; FRANCO, A.; IURESCIA, M.; BATTISTI, A.; DUIM, B.; WAGENAAR, J. A.; VAN DUIJKEREN, E.; WEESE, J. S.; FITZGERALD, J. R.; ROSSANO, A.; GUARDABASSI, L. Clonal spread of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* in Europe and North America: An international multicentre study. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 65, p. 1145–1154, 2010.

PICHERSKY, E.; NOEL, J. P.; DUDAREVA, N. Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity. *Science*, v. 311, p. 808–811, 2006.

PISTELLI, L., MANCIANTI, F., BERTOLI, A.; CIONI, P. L.; LEONARDI, M.; PISSERI, F.; MUGNAINI, L.; NARDONI, S. Antimycotic Activity of Some Aromatic Plants Essential Oils Against Canine Isolates of *Malassezia pachydermatis*: An In Vitro Assay. *The Open Mycology Journal*, v. 6, p. 17-21, 2012.

PRIYANTHA, R., GAUNT, M. C., RUBIN, J. E. Antimicrobial susceptibility of *Staphylococcus pseudintermedius* colonizing healthy dogs in Saskatoon, Canada. *Canadian Veterinary Journal*, v. 57, p. 65-69, 2016.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. Microbiologia veterinária e doenças infecciosas. Porto Alegre, Editora Artmed, 2005.

RAUT, J. S.; KARUPPAYIL, S. M. A status review on the medicinal properties of essential oils. *Industrial Crops and Products*, v. 62, p. 250–264, 2014.

RIBEIRO-SANTOS, R.; CARVALHO-COSTA, D.; CAVALEIRO, C.; COSTA, H. S.; ALBUQUERQUE, T. G.; CASTILHO, M. C.; RAMOS, F.; MELO, N. R.; SANCHES-SILVA, A. A novel insight on an ancient aromatic plant: the rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.). *Trends in Food Science and Technology*, v. 45, p. 355–368, 2015.

ROSA, D.; CRISTIANA, S.; GABRIELLA, P.; RITA, B. A. Antifungal Activity of Different Essential Oils Against *Malassezia* Pathogenic Species. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 249, 2019.

SAAD, N. Y.; MULLER, C. D.; LOBSTEIN, A. Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 28, p. 269–279, 2013.

SASAKI, T.; KIKUCHI, K.; TANAKA, Y.; TAKAHASHI, N.; KAMATA, S.; HIRAMATSU, K. Reclassification of phenotypically identified *Staphylococcus intermedius* strains. *Journal of Clinical Microbiology*, v. 45, p. 2770–2778, 2007.

SIMÕES, R. P.; GROppo, F. C.; DEL FIOl, A. S.; DE SÁ, F.; MATTOS FILHO, T. R.; RAMACCIATO, J. C.; RODRIGUES, M. V. N. Efeito do óleo de *Melaleuca alternifolia* sobre a infecção estafilocócica. *Lecta*, v. 20, p. 143-152, 2002.

SINGH, R.; SHUSHNI, M. A.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. *Arabian Journal of Chemistry*, v. 8, p. 322-328, 2015.

SOARES, B. V., TAVARES-DIAS, M. Espécies de *Lippia* (Verbenaceae), seu potencial bioativo e importância na medicina veterinária e aquicultura. *Biota Amazônia*, v. 3, p. 109-123, 2013.

SOMAYAJI, R.; RUBIN, J. E.; PRIYANTHA, M. A. R.; CHURCH, D. Exploring *Staphylococcus pseudintermedius*: an emerging zoonotic pathogen? *Future Microbiology*, v.11, p. 1371-1374, 2016.

SUMMERS, J. F.; HENDRICKS, A.; BRODBELT, D. C. Prescribing practices of primary care veterinary practitioners in dogs diagnosed with bacterial pyoderma. *BMC veterinary research*, v. 10, p. 240, 2014.

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

TERAUCHI, R.; SATO, H.; HASEGAWA, T.; YAMAGUCHI, T.; AIZAWA, C.; MAEHARA, N. Isolation of exfoliative toxin from *Staphylococcus intermedius* and its local toxicity in dogs. *Veterinary Microbiology*, v. 94, p. 19–29, 2003.

VAN DUIJKEREN, E.; KAMPHUIS, M.; VAN DER MIJE, I. C.; LAARHOVEN, L. M.; DUIM, B.; WAGENAAR, J. A.; HOUWERS, D. J. Transmission of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* between infected dogs and cats and contact pets, humans and the environment in households and veterinary clinics. *Veterinary microbiology*, v. 150, p. 338-343, 2011.

VAN DUIJKEREN, E.; CATRY, B.; GREKO, C.; MORENO, M.A.; POMBA, M.C.; PYORALA, S.; RUZAUSKAS, M.; SANDERS, P.; THRELFALL, E.J.; TORREN-EDO, J.; TÖRNEKE, K. Review on methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v. 66, p. 2705–2714, 2011.

WASEEN, R.; LOW, K. H. Advanced analytical techniques for the extraction and characterization of plant-derived essential oils by gas chromatography with mass spectrometry. *Journal of Separation Science*, v. 38, p. 483-501, 2015.

WEESE, J. S, VAN DUIJKEREN, E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus pseudintermedius* in veterinary medicine. *Veterinary Microbiology*, v. 140, p. 418–429, 2010.

WENDA KOON, C.; SAKAGUCHI, M. Inhibition of Amino Acid Decarboxylase Activity of *Enterobacter Aerogenes* by Active Components in Spices. *Journal of Food Protection*, v. 58, p. 280–283, 1995.

WIŃSKA, K.; MAĆZKA, W.; ŁYCZKO, J.; GRABARCZYK, M.; CZUBASZEK, A.; SZUMNY, A. Essential Oils as Antimicrobial Agents - Myth or Real Alternative? *Molecules*, v. 24, p. 2130, 2019.

WLADYKA, B.; BISTA, M.; SABAT, A. J.; BONAR, E.; GRZESZCZUK, S.; HRYNIEWICZ, W.; DUBIN, A. A novel member of the thermolysin family, cloning and biochemical characterization of metalloprotease from *Staphylococcus pseudintermedius*. *Acta Biochimica Polonica*, v. 55, p. 525–536, 2008.

YAP, P. S. X.; YIAP, B. C.; PING, H. C.; LIM, S. H. E. Essential Oils, a New Horizon in Combating Bacterial Antibiotic Resistance. *The Open Microbiology Journal*, v. 8, p. 06-14, 2014.

ANEXO 1

ATESTADO

Atesto que o Projeto "Avaliação da eficácia antibacteriana dos óleos essenciais de *Melaleuca alternifolia*, *Rosmarinus officinalis* e *Mentha piperita* em isolados de *Staphylococcus pseudintermedius*" **Protocolo CEUA 0025/2022**, a ser conduzido por Júlia Meira, responsável/orientador Luiz Henrique de Araújo Machado, para fins de pesquisa científica/ensino - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal - CONCEA.

Finalidade	PESQUISA CIENTÍFICA
Vigência do projeto	02/05/2022 a 30/09/2022
Nome Comum / Espécie / Linhagem	//
Raça	
Nº de animais machos	0
Nº de animais fêmeas	0
Nº de animais sexo indefinido	0
Peso médio de animais machos	0
Peso médio de animais fêmeas	0
Peso médio de animais sexo indefinido	0
Idade	ano(s) e 0 mes(es) e 0 dia(s).
Procedência	Biblioteca FMVZ-UNESP CEUA nº 0149/2018

Projeto de Pesquisa aprovado em reunião da CEUA em 27/04/2022



JULIANY GOMES QUITZAN

Presidente da CEUA da FMVZ, UNESP - Campus de Botucatu